



**Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας**

**Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Τμήμα ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»**

Διπλωματική Εργασία:

**Αξιολόγηση των P21R & H159Y πολυμορφισμών του γονιδίου του BAFFR
σε ασθενείς με Πολλαπλή Σκλήρυνση.**

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις “Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής” με εξειδίκευση στην “Ανοσολογία”

Λάρισα, 03, 2018

Επιμέλεια: **Παναγιώτης Ντέλλας**

Εξεταστική επιτροπή:

- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
- Ευθύμιος Δαρδιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας





University of
Thessaly

School of Health Science
Faculty of MEDICINE
IMMUNOLOGY Department

Master Program
“Clinical Applications of Molecular Medicine”

Master's Thesis:

**Evaluation of P21R & H159Y-BAFFR gene polymorphisms in patients
with Multiple Sclerosis**

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in “Clinical Applications of Molecular Medicine” with specialization in “Immunology”

Drafted by: **Panagiotis Ntellas**

Examining committee:

- Mathaios Speletas, *Professor of Medical Immunology*
- Anastasios Germanis, *Professor of Laboratory Immunology*
- Euthimios Dardiotis, *Assistant Professor of Neurology*



Περιεχόμενα

Σελίδα

• Περίληψη	6
• Abstract	7
• Πίνακας Συντμήσεων	8
• Πρόλογος	9

Γενικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι. Σκλήρυνση κατά Πλάκας

11-27

• 1. Επιδημιολογία	11
• 2. Αίτια	12-14
○ 2.1 Περιβάλλον	12
○ 2.2 Γενετική προδιάθεση	13
○ 2.3 Λοιμώδεις παράγοντες	13
• 3. Παθοφυσιολογία	15-19
○ 3.1 Απομυελινωτικές πλάκες	15
○ 3.2 Φλεγμονή	16
○ 3.3 Τ-λεμφοκύτταρα	17
○ 3.4 Β-λεμφοκύτταρα	17
○ 3.5 Αντιγονικοί Επίτοποι	18
○ 3.6 Εκφυλιστικές αλλοιώσεις	18
• 4. Κλινική Εικόνα	20-21
○ 4.1 Συμπτωματολογία	20
○ 4.2 Πορεία νόσου	20
○ 4.3 Κλινικά Απομονωμένο Σύνδρομο	21
• 5. Διάγνωση	22
• 6. Θεραπεία	24-26
○ 6.1 Αντιμετώπιση Συμπτωμάτων	24
○ 6.2 Τροποποιητικά της Νόσου Φάρμακα	24
○ 6.3 Βιολογικοί & Αντινεοπλασματικοί Παράγοντες	25
• 7. Πρόγνωση	27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II. BAFF-BAFFR Οδός Σηματοδότησης

28-37

• 1. Ο Συνδέτης	28
• 2. Ο Υποδοχέας	30
• 3. Οι Μεταλλάξεις	32-33
○ 3.1 P21R	32
○ 3.2 H159Y	33
○ 3.3 Κλινική Σημασία	33
• 4. Η Σχέση με την Πολλαπλή Σκλήρυνση	34-37
○ 4.1 Έκφραση BAFF στο ΚΝΣ	34
○ 4.2 Σημασία BAFF υπερέκφρασης	35
○ 4.3 Σημασία των μεταλλάξεων του υποδοχέα στην σκλήρυνση κατά πλάκας.	36

Ειδικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III-Πειραματικό Μέρος

38-64

• 1. Υλικό & Μέθοδοι	38-49
○ 1.1 Σκοπός Μελέτης	38
○ 1.2 Πληθυσμός Μελέτης	38
○ 1.2 Εξαγωγή DNA	39
○ 1.3 Ανίχνευση πολυμορφισμών του γονιδίου του BAFFR	39-47
▪ 1.3A Ενίσχυση των εξονίων 1 & 3/ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	40
▪ 1.3B Ανίχνευση πολυμορφισμών με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων	44
○ 1.4 Καταληκτικά Σημεία	47
○ 1.5 Στατιστική Ανάλυση	48
• 2. Αποτελέσματα	50
○ 2.1 Χαρακτηριστικά ασθενών	50
○ 2.2 Συχνότητες αλληλόμορφων	51
○ 2.3 Βαρύτητα της νόσου (MSSS)	52
▪ 2.3A P21R	52
▪ 2.3B H159Y	54
○ 2.4 Βαθμός Αναπηρίας (EDSS)	55

▪ 2.4A P21R	55
▪ 2.4B H159Y	55
○ 2.5 Ηλικία Έναρξης Νόσου	55
▪ 2.5A P21R	55
▪ 2.5B H159Y	56
○ 2.6 Διάρκεια της νόσου	57
○ 2.7 Ανάλυση της υποομάδας των ασθενών με παρουσία του P21R	57
• 3. Συζήτηση	60-64
○ 3.1 Σύνοψη Ενδείξεων	60
○ 3.2 Αποτελέσματα	61
○ 3.3 Περιορισμοί	62
○ 3.4 Συμπεράσματα	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65-69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μία χρόνια, πολύπαραγοντική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος που ξεκινά κατά την ενήλικη ζωή. Η νόσος χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη προσβολή της μυελίνης, με αποτέλεσμα την εκφύλιση του νευρικού ιστού και την κατάληψη αναπηρίας. Η αίτιο-παθογένεια της νόσου δεν είναι πλήρως καθορισμένη, ωστόσο θεωρείται ότι έχει αυτοάνοσο υπόβαθρο, με γενετικούς παράγοντες και στοιχεία του περιβάλλοντος να συμβάλλουν συνεργικά.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο δυνητικός ρόλος του BAFF στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης. Η οδός σηματοδότησης BAFF-BAFFR σχετίζεται με την επιβίωση των ώριμων Β-λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια, ενώ υπερέκφραση του BAFF έχει συσχετιστεί με διάφορες νόσους αυτοάνοσης αρχής και έχει εντοπιστεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας.

Ο P21R αποτελεί ένα πολυμορφισμό του BAFFR που εντοπίζεται στο εξόνιο 1 του γονιδίου και οδηγεί σε περιορισμένη σύνδεση με τον BAFF. Ο H159Y πολυμορφισμός εντοπίζεται στο εξόνιο 3 και έχει ως αποτέλεσμα ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης μέσω του NF-κΒ μονοπατιού.

Στην παρούσα μελέτη επιδιώξαμε να διερευνήσουμε εάν διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά της σκλήρυνσης κατά πλάκας επηρεάζονται από την παρουσία των P21R & H159Y πολυμορφισμών του BAFFR και να εκτιμήσουμε τη συχνότητα εμφάνισης τους στην ομάδα των ασθενών συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό.

ΜΕΘΟΔΟΙ: Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 517 ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας που αντιμετωπίστηκαν στη Νευρολογική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών σε δείγμα γενετικού υλικού των ασθενών έγινε σε δύο βήματα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης όπου ενισχύθηκαν το εξόνιο 1 και το εξόνιο 3 του γονιδίου του BAFFR. Στη συνέχεια με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων έγινε πέψη των ενισχυμένων τμημάτων DNA με σκοπό την ταυτοποίηση των αλληλόμορφων.

Διερευνήσαμε τη σχέση των πολυμορφισμών με τη βαρύτητα της νόσου, το βαθμό αναπηρίας, την ηλικία έναρξης και τη διάρκεια της νόσου. Επίσης αναλύθηκαν οι συχνότητες εμφάνισης των πολυμορφισμών στους ασθενείς και σε υγιείς μάρτυρες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Στην παρούσα μελέτη δεν κατορθώσαμε να αποδείξουμε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης μεταξύ της γονοτυπικής κατανομής των P21R και H159Y πολυμορφισμών με τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, με εξαίρεση την ύπαρξη διαφοράς στην ηλικία έναρξης της νόσου σε P21R(+)/H159Y(+) ασθενείς έναντι P21R(+)/H159Y(-) ασθενών, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επίσης, παρατηρήσαμε παρόμοιες συχνότητες των αλληλόμορφων μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Παρά την αποτυχία της μελέτης να συσχετίσει τον φαινότυπο την νόσου με την παρουσία των πολυμορφισμών, υπάρχουν ενδείξεις όσων αφορά την ηλικία έναρξης, και δεδομένου ότι η συμβολή της οδού σηματοδότησης BAFF-BAFFR στην παθογένεια της νόσου δεν είναι ξεκάθαρη, απαιτείται περεταίρω έρευνα για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Multiple sclerosis (MS) is a chronic, debilitating disease of the central nervous system that begins in adulthood. Inflammation and demyelination are considered a hallmark MS lesions, resulting in nerve degeneration and disability. Multiple sclerosis has a strong autoimmune influence, but no clear etiology. Overall, both genetic and environmental factors contribute synergistically with the role of the immune system in the pathogenesis of the disease being emphasized early on.

An emerging area of research is the potential role of BAFF in MS pathophysiology. The biological role of BAFF-BAFFR signaling pathway is tied up with the survival of the peripheral B cell subpopulation, whereas BAFF overexpression has been associated with various autoimmune diseases and has been found in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis.

P21R polymorphism is located on exon 1 of the BAFFR gene and affects the binding capability of the receptor to BAFF. H159Y polymorphism is located on exon 3 of the BAFFR gene and is associated with NF- κ B pathway activation.

In the present study we aimed to explore whether various clinical characteristics of MS are influenced by the presence of P21R AND H159Y polymorphisms on BAFFR.

METHODS: The study consisted of 517 patients with MS, that were treated in the Neurology department of Larissa University Hospital. The detection of BAFFR-P21R and BAFFR-H159Y polymorphisms was performed by PCR amplification of exon-1 and 3 of the BAFFR gene respectively, followed by restriction fragment length polymorphism (RLFP) analysis.

We aimed to examine whether the presence of P21R and H159Y polymorphisms would influence MS disease severity, disability status, age of onset and disease duration. We also assessed the frequencies of the polymorphisms between MS patients and healthy controls.

RESULTS: Genotype distribution of P21R and H159Y on MS patients showed no significant correlation with disease severity, Age of Onset, Disease Duration and disability status. Nonetheless, there seemed to be an earlier age of disease onset for P21R(+)/H159Y(+) patients, against P21R(+)/H159Y(-) patients, however, it was not statistically significant. Also, similar allele frequencies were reported between MS patients and healthy controls.

CONCLUSION: The present study failed to correlate the presence of the polymorphisms with the phenotype of the disease. However, some indications considering the age of onset do exist and as the contribution of the BAFF-BAFFR signaling pathway to the pathogenicity of multiple sclerosis is not clear, further investigation is needed to clarify their role.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

- **BAFF** B-cell activating factor - παράγοντας ενεργοποίησης των B λεμφοκυττάρων.
- **BCMA** B cell maturation antigen - αντιγόνο ωρίμανσης των B κυττάρων.
- **bp** base pairs- ζεύγη βάσεων.
- **CVID** Common variable immunodeficiency - κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια.
- **EDSS** Expanded Disability Status Scale - διευρυμένη κλίμακα αναπηρίας.
- **hm** Homozygotes- Ομοζυγότες.
- **ht** Heterozygotes – Ετεροζυγότες.
- **MS** Multiple sclerosis – Πολλαπλή Σκλήρυνση.
- **MSSS** Multiple sclerosis severity scale – Βαθμός βαρύτητας πολλαπλής σκλήρυνσης.
- **NgR** Nogo 66 υποδοχέας.
- **RLFP** Restriction fragment length polymorphism.
- **TACI** transmembrane activator and cytophilin ligand interactor- Διαμεμβρανικός ενεργοποιητής με αλληλεπίδραση συνδέτη κυκλοφιλίνης.
- **wt** Wild type.
- **ΚΝΣ** Κεντρικό νευρικό σύστημα.
- **ΠΣ** Πολλαπλή σκλήρυνση.
- **ΣΕΛ** Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος.
- **ΣΚΠ** Σκλήρυνση κατά πλάκας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ) ή είναι μία χρόνια, πολυπαραγοντική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και προσβολή των ολιγοδενδροκυττάρων που σχηματίζουν τα έλυτρα μυελίνης των νευραξόνων στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό [1], με τελικό αποτέλεσμα την εκφύλιση των νευραξόνων. Ξεκινά κατά την ενηλικίωση με ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων που χαρακτηρίζονται από κινητικές, αισθητηριακές, οπτικές, πνευματικές, ακόμη και ψυχιατρικές διαταραχές, ενώ χαρακτηρίζεται από την κατάληψη αναπηρίας [1, 2]. Η τοποθεσία στο ΚΝΣ όπου δημιουργούνται οι αλλοιώσεις καθορίζει και το είδος των συμπτωμάτων που παρουσιάζονται. Η κλινική πορεία την νόσου είναι αρκετά ετερογενής ωστόσο έχουν αναγνωριστεί δύο ξεχωριστά μοτίβα. Η μία μορφή της πολλαπλής σκλήρυνσης (ΠΣ) χαρακτηρίζεται από πολλαπλά επεισόδια εξάρσεων της νόσου με αναπαραγωγή των ανάλογων συμπτωμάτων ακολουθούμενη από διαλείμματα ελεύθερης νόσου. Η μορφή αυτή της νόσου ονομάζεται υποτροπιάζουσα διαλείπουσα σκλήρυνση κατά πλάκας, είναι η συχνότερη και η παθογένεια της έχει συσχετιστεί με την παρουσία οξέων φλεγμονωδών προσβολών στο ΚΝΣ. Η δεύτερη μορφή της νόσου είναι η προϊούσα προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας, χαρακτηρίζεται εξ αρχής από πρόοδο της νόσου χωρίς περιόδους ύφεσης και η παθογένεια της έχει συσχετιστεί με την παρουσία εκφυλιστικών αλλοιώσεων στον νευρικό ιστό. Δευτερογενώς, άτομα με διαλείπουσα νόσο μπορούν να μεταπέσουν με την πάροδο του χρόνου στην προοδευτική μορφή της νόσου.

Ο Charcot, αν και δεν ήταν ο πρώτος που περιέγραψε τη σκλήρυνση κατά πλάκας, ήταν αυτός που διατύπωσε με αποτελεσματικό τρόπο τα κλινικά και παθολογο-ανατομικά χαρακτηριστικά από τα οποία απαρτίζεται η νόσος αυτή [3] και οι παρατηρήσεις του ουσιαστικά ήταν εκείνες που οδήγησαν το 1968 στην εδραίωση της πολλαπλής σκλήρυνσης ως ξεχωριστή κλινική οντότητα [4]. Ενδιαφέρων παρουσιάζει το γεγονός ότι η ονομασία της νόσου, “πολλαπλή σκλήρυνση”, προέρχεται από στις ουλές που παρατηρούνται στην λευκή ουσία του ΚΝΣ δηλαδή του εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης [4]. Η αίτιο-παθογένεια της νόσου δεν είναι πλήρως καθορισμένη, ωστόσο θεωρείται ότι έχει αυτοάνοσο υπόβαθρο, με γενετικούς παράγοντες και στοιχεία του περιβάλλοντος να συμβάλουν συνεργικά [2, 5, 6].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια ο δυνητικός ρόλος του παράγοντα ενεργοποίησης των Β-λεμφοκυττάρων (BAFF) στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης. Ο BAFF εκφράζεται κυρίως από κύτταρα μυελώδους προέλευσης, ωστόσο η έκφρασή του έχει εντοπιστεί και από αστροκύτταρα σε ασθενείς με λεμφώματα του ΚΝΣ και σκλήρυνση κατά πλάκας. Ο βιολογικός ρόλος του BAFF έχει να κάνει με την επιβίωση των ώριμων Β-κυτταρικών πληθυσμών στην περιφέρεια, όπου παρατείνει την επιβίωση τους. Η υπερέκφραση όμως του BAFF έχει συσχετιστεί με διάφορες νόσου αυτοάνοσης αρχής όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος και το σύνδρομο Sjogren, ενώ έχει εντοπιστεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στις αλλοιώσεις στο ΚΝΣ ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας.

Ο BAFFR είναι ο υποδοχέας που πιστεύεται ότι μεταδίδει τα κρίσιμα σήματα επιβίωσης στα Β-λεμφοκύτταρα που σχετίζονται με τη διέγερση από τον BAFF. Πρόσφατα όμως ο Nogo-66 υποδοχέας (NgR) έχει επίσης αναγνωριστεί ως υποδοχέας υψηλής συγγένειας για τον BAFF. Ο NgR εκφράζεται σε νευρώνες και μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη τους σε απόκριση της σηματοδότησης του BAFF. Επιπλέον, αδυναμία σύνδεσης του BAFF στον BAFFR εκτός από την προφανή προσβολή των Β-κυτταρικών πληθυσμών στην περιφέρεια, μπορεί πιθανώς να οδηγήσει και σε αυξημένη έκφραση του BAFF.

Ο P21R πολυμορφισμός εντοπίζεται στο εξόνιο 1 του γονιδίου του BAFFR και προκύπτει από αντικατάστασης βάσης, η οποία οδηγεί στην αλλαγή ενός αμινοξέος στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, γεγονός που περιορίζει την ικανότητα σύνδεσης του BAFFR με τον BAFF. Ο H159Y πολυμορφισμός, βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) με τον P21R. Εντοπίζεται στο 3^ο εξόνιο, και προκύπτει επίσης από μία αντικατάσταση βάσεως, η οποία οδηγεί σε αλλαγή ενός αμινοξέος στην ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα που επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις του BAFFR με μόρια Traf, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης μέσω του NF-κΒ μονοπατιού.

Στην παρούσα μελέτη επιδιώξαμε να διερευνήσουμε εάν διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά της σκλήρυνσης κατά πλάκας, όπως η βαρύτητα της νόσου ή η ηλικία των αρχικών συμπτωμάτων, επηρεάζονται από την παρουσία των P21R & H159Y πολυμορφισμών στον BAFFR και εκτιμήσαμε τη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών στην ομάδα των ασθενών συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι. Σκλήρυνση κατά Πλάκας

1. Επιδημιολογία

Η σκλήρυνση κατά πλάκας αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αιτίες πρόκλησης νευρολογικής βλάβης σε νεαρούς ενήλικες. Πλήττει περίπου 2,5 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο, ενώ η ετήσια επίπτωση της παγκοσμίως ανέρχεται 4,2 ασθενείς ανά 100.000 πληθυσμό, με τη συχνότητα εμφάνισης όμως να παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις ανάλογα την περιοχή [7]. Σε παλαιότερες επιδημιολογικές μελέτες το γεωγραφικό πλάτος έχει αναφερθεί ως παράγοντας διακύμανσης του επιπολασμού παγκοσμίως [7-10], γεγονός όμως που αμφισβητείτε τα τελευταία χρόνια, δίνοντας θέση στην επίδραση των γενετικών παραγόντων και της καταγωγής [11, 12]. Παρόλα αυτά η διαμάχη σχετικά με την επίδραση της γεωγραφικής κατανομής έναντι της γενετικής ευαισθησίας συνεχίζεται μέχρι σήμερα [11]. Βάση γεωγραφίας οι χώρες της μεσογείου θεωρούνται ότι ανήκουν στη ζώνη μέτριου ή και χαμηλού επιπολασμού της νόσου [13, 14] με μέση τιμή 60 ασθενείς ανά 100.000 άτομα και ετήσια επίπτωση 3,7 ασθενείς ανά 100.000 άτομα [7]. Στον Ελληνικό πληθυσμό ο επιπολασμός της νόσου δεν είναι σαφής, η πιο πρόσφατη μελέτη που έγινε στον πληθυσμό της Θράκης και του Έβρου εκτιμά τον επιπολασμό σε 38,9 ασθενείς ανά 100.000 άτομα [14], ενώ βάση παλιότερων επιδημιολογικών μελετών ο επιπολασμός σε διάφορες περιοχές της Ελλάδος φαίνεται να κυμαίνεται μεταξύ 10,2 και 29,5 ασθενείς ανά 100.000 άτομα [15, 16].

Η σκλήρυνση κατά πλάκας μιμούμενη τη μεροληψία που συναντάμε και σε άλλες νόσους αυτοάνοσης αρχής, προσβάλει 2 φορές περισσότερο τις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες [2] και επίσης φαίνεται να έχει μία προτίμηση για τους Καυκάσιους πληθυσμούς [6]. Στον Ελληνικό πληθυσμό βάση των πιο πρόσφατων δεδομένων ο λόγος γυναικών-ανδρών είναι 2,8 προς 1. Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι τα 27,4 χρόνια για τις γυναίκες και 30,4 για τους άνδρες, ενώ η μέση διάρκεια νόσου είναι τα 9,4 χρόνια. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της πολλαπλής σκλήρυνσης εμφανίζεται στην ηλικιακή ομάδα των νεαρών ενηλίκων δηλαδή σε άτομα μεταξύ 25 και 39 ετών [14].

2. Αίτια

Η σκλήρυνση κατά πλάκας θεωρείται πολυπαραγοντική νόσος, τα ακριβή όμως αίτια είναι άγνωστα. Οι ερευνητές έχουν καταλήξει ότι τόσο το περιβάλλον, όσο και ορισμένοι λοιμώδεις και γενετικοί παράγοντες συμβάλουν στην εκδήλωση της νόσου. Εκτός όμως από αυτές τις τρεις κατηγορίες, άλλοι παράγοντες που έχουν εξεταστεί είναι το κάπνισμα, το άγχος, η διατροφή, η έκθεση σε κάποιους εργασιακούς παράγοντες, ιδίως τοξίνες, χωρίς όμως οι ερευνητές να έχουν καταλήξει σε κάποια ασφαλή συμπεράσματα [17, 18].

2.1 Περιβάλλον

Η θεωρία του γεωγραφικού πλάτους έχει ως πιο πιθανή εξήγηση τη συνεισφορά του περιβάλλοντος, καθώς έχει φανεί ότι η πολλαπλή σκλήρυνση είναι συχνότερη σε ανθρώπους που ζουν πιο μακριά από τον ισημερινό, ενώ πολλοί είναι αυτοί που έχουν αμφισβητήσει αυτή τη θεωρία, καθώς έχουν εντοπιστεί εξαιρέσεις σε ορισμένες εθνικές ομάδες όπου η συχνότητα της νόσου δεν συμβαδίζει με τον επιπολασμό της περιοχής όπου βρίσκονται [19, 20]. Παρόλα αυτά στην Ευρώπη η πολλαπλή σκλήρυνση εξακολουθεί να εμφανίζεται συχνότερα στις βόρειες χώρες [1]. Σαν μία εξήγηση έχει προταθεί η μειωμένη έκθεση στο ηλιακό φως που οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή βιταμίνης D [17, 21], ή αντιθέτως η γεωγραφική απόκλιση μπορεί απλώς να αντανakλά τη παγκόσμια διανομή πληθυσμών υψηλού κινδύνου λόγω εθνότητας [22]. Εκτός όμως από την εθνική καταγωγή, το περιβάλλον όπου ένα άτομο μεγαλώνει έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς άνθρωποι που μεταναστεύουν σε μία διαφορετική περιοχή του κόσμου πριν την ηλικία των 15 ετών φαίνεται να αποκτούν τον ίδιο σχετικό κίνδυνο για ανάπτυξη της νόσου που υπάρχει στην περιοχή όπου μετακομίζουν, ενώ το άτομο διατηρεί τον κίνδυνο της περιοχής από όπου κατάγεται εάν μεταναστεύσει μετά τα 15 έτη της ηλικίας του [1, 18].

2.2 Γενετική προδιάθεση

Η σκλήρυνση κατά πλάκας δεν θεωρείται ότι είναι κληρονομική ασθένεια βάση του κλασικού μενδελικού χαρακτήρα. Χαρακτηρίζεται όμως από την ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης, που σημαίνει ότι άτομα που φέρουν μία σειρά αλλαγών στο γενετικό τους υλικό, κάποιους πολυμορφισμούς ή μεταλλάξεις, έχουν αυξημένη πιθανότητα να αναπτύξουν τη νόσο [23]. Για παράδειγμα, όπως αναφέραμε και παραπάνω ορισμένες εθνικές ομάδες έχουν χαμηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν πολλαπλή σκλήρυνση, μία τέτοια ομάδα είναι οι Μαορί της Νέας Ζηλανδίας [20], ενώ άλλες εθνικές ομάδες έχουν αυξημένο όπως οι Σαρδίνιοι και οι Παλαιστίνιοι [20, 22]. Επίσης, άτομα με συγγενείς που πάσχουν από πολλαπλή σκλήρυνση φέρουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν τη νόσο και ο κίνδυνος μεγαλώνει όσο πιο στενή είναι η συγγένεια, με τους μονοζυγωτικούς διδύμους να έχουν έως και 30% πιθανότητα να προσβληθούν και οι δύο [1, 22]. Εδώ και 5 δεκαετίες έχει αναγνωριστεί η συσχέτιση της νόσου με ορισμένα αλληλία του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας [1]. Πιο συγκεκριμένα πολυμορφισμοί στις περιοχές HLA-DR15 & HLA-DQ6 του χρωμοσώματος 6 όπου εδράζονται ορισμένα από τα γονίδια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας έχουν αναγνωριστεί ως προγνωστικοί -προδιαθεσικοί δείκτες για την εμφάνιση της νόσου. Επιπρόσθετα πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει μια σχετική προστασία σε άτομα που φέρουν αλλαγές στις θέσεις HLA-C5 & HLA-DRB1*11, αντιθέτως άτομα με πολυμορφισμούς στα γονίδια για την α- αλυσίδα του υποδοχέα των ιντερλευκινών 2 & 7 παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένη πιθανότητα προσβολής [1].

2.3 Λοιμώδεις παράγοντες

Διάφοροι μικροβιακοί παράγοντες έχουν διερευνηθεί ως ερεθίσματα πιθανώς υπεύθυνα για την εκδήλωση της νόσου, χωρίς όμως κάποια επιβεβαίωση. Η θεωρίες που υπάρχουν πίσω από αυτή τη σκέψη είναι είτε η υπόθεση της υγιεινής που προτείνει ότι άτομα που είχαν έρθει σε επαφή με διάφορους μολυσματικούς παράγοντες στα αρχικά στάδια της ζωής τους φέρουν κάποια προστασία στην μετέπειτα ζωή τους για ανάπτυξη πολλαπλής σκλήρυνσης, είτε η επαφή με κάποιους μολυσματικούς παράγοντες που ενδημούν σε κάποιες περιοχές μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου [24]. Σε αντίθεση με τους μικροβιακούς παράγοντες, οι ιοί έχουν πιο θερμούς υποστηρικτές ως αιτίες έναρξης της νόσου, ίσως εξαιτίας του γεγονότος

ότι ορισμένοι ιοί προκαλούν απομυελίνωση στα πλαίσια της εγκεφαλομυελίτιδας [25]. Διάφοροι ιοί της ομάδας των ερπητοϊών έχουν ενοχοποιηθεί, με τον Epstein-Barr ιό να θεωρείται ότι αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο για εκδήλωση σκλήρυνσης κατά πλάκας εάν έχει προηγηθεί λοίμωξη κατά την πρώιμη ενήλικη ζωή [1].

3. Παθοφυσιολογία

Η παρουσία των απομυελινωτικών πλακών αποτελεί χαρακτηριστική παθολογο-ανατομική εικόνα των βλαβών στη σκλήρυνση κατά πλάκας. Πιο συγκεκριμένα η βλάβη του νευρικού ιστού σχετίζεται με καταστροφή της νευρογλοίας και απώλεια ολιγοδενδροκυττάρων που οδηγούν σε απομυελίνωση, με την δυνατότητα επαναμυελίνωσης να είναι περιορισμένη [6, 26, 27]. Εξαιτίας της καταστροφής της μυελίνης, σταδιακά παρατηρείται εκφυλισμός των νευραξόνων των νευρικών κυττάρων, γεγονός που οδηγεί με την πάροδο του χρόνου στην εγκατάσταση λειτουργικών επιπλοκών και αναπηρίας [6, 27]. Η φλεγμονή θεωρείται σήμα κατατεθέν των οξέων βλαβών την σκλήρυνσης κατά πλάκας και χαρακτηρίζεται από διήθηση T & B λεμφοκυττάρων, ενεργοποιημένων μακροφάγων και μικρογλοίας [6, 27-29]. Ωστόσο, η συμβολή της φλεγμονής είναι λιγότερο έκδηλη στην προϊούσα προοδευτική νόσο, όπου κυριαρχούν εξ αρχής οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις [6] και θεωρείται ότι οι δύο κλινικοί υπότυποι (υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα και προϊούσα προοδευτική νόσος) διαφέρουν στην παθοφυσιολογία τους, με την προσφορά της φλεγμονής να είναι πιο εμφανής στην υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα νόσο. Εν ολίγης πρόκειται για μία πολύπαραγοντική νόσος, η αιτοπαθογένεια της οποίας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Θεωρείται όμως ότι, κατά βάση αποτελεί μία ανοσιακή διαταραχή στην οποία συμμετέχουν περιβαλλοντολογικοί παράγοντες και η γενετική προδιάθεση του ατόμου [1, 2].

3.1 Απομυελινωτικές πλάκες

Το όνομα σκλήρυνση κατά πλάκας προήλθε παρατηρώντας τις χαρακτηριστικές ουλές που σχηματίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα μπορούν να παρατηρηθούν στη λευκή ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, το οπτικό νεύρο, το εγκεφαλικό στέλεχος και τα βασικά γάγγλια, ενώ το περιφερικό νευρικό σύστημα μένει ανεπηρέαστο [1, 2]. Οι αλλοιώσεις αυτές προκύπτουν από τοπική καταστροφή της νευρογλοίας, που σχηματίζει το υποστηρικτικό περιβάλλον μέσα στο οποίο λειτουργούν τα νευρικά κύτταρα. Το είδος των κυττάρων που κατά βάση προσβάλλεται είναι τα ολιγοδενδροκυττάρα. Τα ολιγοδενδροκυττάρα είναι υπεύθυνα

για το σχηματισμό των περιβλημάτων μυελίνης, τα οποία όπως μαρτυρά και το όνομα τους περιβάλλουν τους νευράξονες των νευρικών κυττάρων. Το μυελινικό έλυτρο ευοδώνει την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη μετάδοση του δυναμικού ενεργείας, με αποτέλεσμα η απώλεια των ελύτρων να οδηγεί στη προβληματική μεταφορά του ηλεκτρικού δυναμικού κατά μήκος των νευραξόνων που σημαίνει ότι ο νευρώνας να αδυνατεί να μεταδώσει τα ηλεκτρικά σήματα [6, 27-29].

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί ότι εμπλέκονται στην παθογένεση της ιστικής βλάβης στην σκλήρυνση κατά πλάκας. Ένας τέτοιος μηχανισμός προτείνει ότι η βλάβη σχετίζεται με τα T-λεμφοκυτταρικά διηθήματα και τα μακροφάγα. Επίσης, ο ρόλος των αντισωμάτων έναντι των ολιγοδενδροκυττάρων και της μυελίνης έχει ενοχοποιηθεί, προκαλώντας βλάβη διαμέσου του συμπληρώματος. Επιπλέον, αναφέρεται ότι η ιστική βλάβη σχετίζεται με την υποξία, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αγγειακή βλάβη λόγω της φλεγμονής ή να πυροδοτείτε από τοξίνες που προέρχονται από τα μακροφάγα και επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Τέλος η ύπαρξη ορισμένων γενετικών πολυμορφισμών σε κάποια άτομα μπορεί να τα καθιστά ευαίσθητα στην καταστροφή των ολιγοδενδροκυττάρων. Συνήθως σε κάθε περίπτωση ενεργούν περισσότεροι του ενός μηχανισμοί [1]. Ανεξαρτήτως όμως του μηχανισμού που δρα, τελικώς η απομυελίνωση των νευραξόνων οδηγεί στην εκφύλιση τους. Στα αρχικά στάδια της νόσου μετά από κάθε παροξυσμό, λαμβάνει χώρα μία προσπάθεια επιδιόρθωσης των βλαβών, ωστόσο η επαναμυελίνωση που συμβαίνει είναι περιορισμένη και δεν επαρκεί για να αναδομηθούν πλήρως το σύνολο των περιβλημάτων μυελίνης που έχουν υποστεί βλάβη [30].

3.2 Φλεγμονή

Στις αλλοιώσεις που σχηματίζονται στην πολλαπλή σκλήρυνση παρατηρείται μία φλεγμονώδης διήθηση η οποία απαρτίζεται από CD4-T λεμφοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα, ενεργοποιημένα μακροφάγα και αστροκύτταρα με υπεροχή όμως των CD8-T λεμφοκυττάρων [1, 6]. Εικάζεται ότι η φλεγμονώδης διαδικασία ξεκινά με την αυξημένη μετανάστευση αυτό-αντιδραστικών T-λεμφοκυττάρων διαμέσου του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού. Η μετάβαση από τη κατάσταση φυσιολογικής επιτήρησης στην επικράτηση παθολογικής φλεγμονής προκύπτει από τη διαταραχή ρυθμιστικών μηχανισμών του ανοσιακού συστήματος που επιτρέπουν σε αυτά τα

κύτταρα να δημιουργήσουν ανοσο-απάντηση μέσα στο ΚΝΣ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αποτυχία των ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, να καταστείλουν τα εκτελεστικά κύτταρα σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας [31]. Πιθανώς η περεταίρω αποτυχία των τοπικών ρυθμιστικών μηχανισμών στο ΚΝΣ, να οφείλεται για τον σχηματισμό των εντοπισμένων φλεγμονωδών εστιών.

3.3 T-λεμφοκύτταρα

Βάση της παρατήρησης σε πειραματικά μοντέλα ποντικών ότι η νόσος επιδεινώνεται με χορήγηση της INF- γ , θεωρήθηκε αρχικώς ότι οι αλλοιώσεις στην σκλήρυνση κατά πλάκας προκαλούνται από ανοσιακές απαντήσεις τύπου 1 (Th1) [6]. Ωστόσο το CD4⁺ Th1 μοντέλο αμφισβητήθηκε εξαιτίας αντικρουόμενων δεδομένων από θεραπευτικές δοκιμές και ένας νέος τύπος βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων εντοπίστηκε, τα οποία παράγουν ιντερλευκίνη 17 και θεωρούνται ότι οδηγούν την φλεγμονώδη απάντηση στη σκλήρυνση κατά πλάκας. Η ιντερλευκίνη 17 μαζί με την ιντερλευκίνη 22 διαταράσσουν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό και επιτρέπουν στα Th17 λεμφοκύτταρα να διεισδύσουν στο ΚΝΣ, όπου μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στους νευρώνες [1].

3.4 B-λεμφοκύτταρα

Παραδοσιακά τα T-λεμφοκύτταρα ήταν εκείνα που θεωρούνταν κρίσιμα ανοσολογικά στοιχεία απαραίτητα στην παθογένεια της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Πρόσφατα, φάνηκε ότι και τα B-λεμφοκύτταρα έχουν κεντρικό ρόλο στην επαγωγή της νόσου. Η ενεργοποίηση των αυτό-αντιδραστικών T-λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ θα πυροδοτήσει την παραγωγή διάφορων μεσολαβητών, όπως χημειοκίνες και κυτοκίνες, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση άλλων φλεγμονωδών κυττάρων, συμπεριλαμβανόμενων των B-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Τα B-λεμφοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να περάσουν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό, να ενεργοποιηθούν και αν υποστούν αντιγονο-ειδική κλωνική επέκταση. Η φλεγμονώδης αντίδραση που προκύπτει σε συνδυασμό με τα T λεμφοκύτταρα και άλλα κύτταρα μπορεί αν οδηγήσει στη δημιουργία απομυελινωτικών βλαβών στο ΚΝΣ. Πιο συγκεκριμένα η παραγωγή IgG μπορεί να προκαλέσει απομυελίνωση και αξονική βλάβη με έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από το συμπλήρωμα [27]. Επίσης, τα B-

λεμφοκύτταρα έχουν την ικανότητα να δημιουργούν έκτοπα λεμφοζίδια, έξω από τα λεμφικά όργανα, σε περιοχές φλεγμονής. Αυτά τα λεμφοζίδια αποτελούν μία τοπική πηγή ενεργοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ που συμβάλουν στην ανοσολογική αντίδραση [27]. Τέλος, τα Β-λεμφοκύτταρα μπορεί να δράσουν ως αποτελεσματικά αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα οδηγώντας σε ιδανική αντιγονο-ειδική ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Η λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων υποστηρίζεται μέσω της έκκρισης ορισμένων κυτοκινών. Μεταξύ αυτών είναι και ο ενεργοποιητικός παράγοντας των Β-λεμφοκυττάρων (BAFF). Η έκφραση του BAFF, βρέθηκε αυξημένη σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση. Πιστεύεται ότι η διατήρηση του BAFF μέσα σε ορισμένα όρια είναι απαραίτητη ώστε να επιτευχθεί ισορροπία των προ-φλεγμονωδών παραγόντων και ότι μπορεί να αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για τη θεραπεία της νόσου [27]

3.5 Αντιγονικοί Επίτοποι

Λόγω της αυξημένης διήθησης των κυτταρο-τοξικών CD8-T λεμφοκυττάρων, της κλωνικής συσσώρευσης τους στις απομυελινωτικές πλάκες και της παρουσίας Β λεμφοκυττάρων υποστηρίζεται ότι η ανοσιακή απόκριση είναι έντονα ειδική και εστιασμένη έναντι κάποιου αντιγόνου[6]. Ωστόσο η αντιγονική ειδικότητα αυτών των ανοσοαπαντήσεων έχει παραμείνει άλυτη, ενώ η υπόθεση για το ρόλο της μυελίνης ως αντιγονικό επίτοπο έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση [1, 6]. Οι αντιγονικοί επίτοποι που έχουν ενοχοποιηθεί αποτελούν συστατικά του ΚΝΣ όπως: “myelin basic protein, myelin oligodendrocyte glycoprotein, αB-crystalline, neurofascin, sperm-associated antigen 16, coronin-1a, heat shock proteins ” [1, 27].

3.6 Εκφυλιστικές αλλοιώσεις

Ανεξάρτητα των αιτιών εμφάνισης των συμπτωμάτων, η πρόοδος της νόσου στην πολλαπλή σκλήρυνση εξαρτάται από την συσσώρευση εκφυλιστικών αλλοιώσεων στους νευράξονες των νευρώνων. Οι θέσεις των ερευνητών έχουν μετατοπιστεί τα τελευταία χρόνια από την άποψη ότι η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι αμιγώς μία απομυελινωτική νόσος, εστιάζοντας περισσότερο στον ρόλο των αξονικών αλλοιώσεων και στην εξάρτησή τους από τη φλεγμονή. Τέσσερις υποθέσεις έχουν

διατυπωθεί: Πρώτων, η φλεγμονή αποτελεί το μοναδικό παθογενετικό γεγονός και όλα τα υπόλοιπα ακολουθούν. Δεύτερων, η νευρο-εκφύλιση εμφανίζεται αρχικά με τη φλεγμονή να αποτελεί μια δευτερεύουσα απάντηση. Τρίτων, τόσο η φλεγμονή, όσο και η νευρο-εκφύλιση συμβάλλουν ισάξια στην κλινική εικόνα, αποτελούν όμως ανεξάρτητα γεγονότα. Και τέλος, η φλεγμονή εκθέτει τους νευράξονες σε διαδικασία εκφύλισης, ενώ τους καθιστά και περισσότερο ευαίσθητους σε συσσωρευτικό τραυματισμό.

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι ρόλος της φλεγμονής είναι καθοριστικός στον σχηματισμό των βλαβών που παρατηρούνται στην πολλαπλή σκλήρυνση, με τα CD8-T λεμφοκύτταρα να ευθύνονται για την καταστροφή της μυελίνης κατά την διάρκεια των παροξυσμών της νόσου και τη δημιουργία των χαρακτηριστικών πλακών [1, 26]. Επιπλέον, λεμφοζίδια από B-κύτταρα συσσωρεύονται στις μήνιγγες διατηρώντας μία διαμερισματοποιημένη ανοσο-απόκριση εντός του ΚΝΣ με την παραγωγή αυτό-αντιδραστικών αντισωμάτων [1]. Οι μηχανισμοί όμως που σχετίζονται με τη φλεγμονή, πιθανώς να οφείλονται και για την έναρξη μιας αυτοσυντηρούμενης νευρο-εκφυλιστικής διαδικασίας που παρατηρείται σε επόμενα στάδια, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην εξελικτική πορεία της νόσου [26]. Με την έναρξη της προοδευτικής νόσου, απομυελινωτικές εστίες συνυπάρχουν με περιοχές όπου παρατηρείται διάχυτος εκφυλισμός του νευρικού παρεγχύματος. Οι αλλοιώσεις μεγαλώνουν αργά με ακτινική επέκταση καθώς η εστιακή φλεγμονή αντικαθιστάτε σταδιακά με την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, έχοντας ως αποτέλεσμα την δημιουργία εκτεταμένων νευρο-εκφυλιστικών αλλοιώσεων στη λευκή ουσία [1]. Εν ολίγης, η αθροιστική απώλεια των νευραξόνων, την οποία πυροδοτεί και διατηρεί η φλεγμονή, σε άτομα που είναι επιρρεπή στην νευρο-εκφύλιση οφείλεται για την πρόοδο της νόσου.

4. Κλινική Εικόνα

4.1 Συμπτωματολογία

Η σκλήρυνση κατά πλάκας χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ σύνολο κλινικών αλλά και παθολόγο-ανατομικών φαινοτύπων, αντανακλώντας ίσως διαφορετικές οδούς πρόκλησης βλάβης του νευρικού ιστού [28]. Το φάσμα των συμπτωμάτων μπορεί να περιλαμβάνει σχεδόν οποιοδήποτε νευρολογικό σύμβαμα, με τις κινητικές διαταραχές, τα προβλήματα από το αυτόνομο νευρικό σύστημα, τις αισθητηριακές και οπτικές διαταραχές να αποτελούν τα πιο συχνά. Για παράδειγμα η απώλεια αίσθησης ή η εμφάνιση νυγμοειδούς άλγους στα άκρα συγκαταλέγονται στις αισθητηριακές διαταραχές. Κινητικές διαταραχές, μπορεί να εκδηλωθούν με δυσκολία στην κίνηση και στην κατάποση (δυσφαγία), αδυναμία συντονισμού των κινήσεων, ενώ επίσης μπορούν να εμφανιστούν μυϊκή αδυναμία ή και σπαστικότητα. Από την όραση, τα προβλήματα περιλαμβάνουν τη διπλωπία, τη μειωμένη οπτική οξύτητα έως και τη πλήρη απώλεια όρασης εξαιτίας της δημιουργίας οπτικής νευρίτιδας. Στο αυτόνομο νευρικό σύστημα συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων προβλήματα από το έντερο, την ουροδόχο κύστη και στη στύση. Επιπλέον, επηρεάζονται και οι ανώτερες πνευματικές λειτουργίες, με την εμφάνιση γνωστικών δυσλειτουργιών όπως η απώλεια προσοχής, η παρακμή των εκτελεστικών λειτουργιών ή ακόμη και η εμφάνιση άνοιας, ενώ και συχνή είναι η παρουσία της κατάθλιψης [1]. Χαρακτηριστικό της πολλαπλής σκλήρυνσης είναι ότι η παρουσία της εκάστοτε συμπτωματολογίας εξαρτάτε από τη θέση των βλαβών στο ΚΝΣ.

4.2 Πορεία Νόσου

Εκτός όμως από το σύμπτωμα αυτό καθαυτό και η συχνότητα εμφάνισης των συμπτωμάτων ποικίλει, με τους ασθενείς να διαδράμουν χαρακτηριστικές αλλά και ποικίλες κλινικές πορείες. Παρά όμως την ετερογένεια, συνολικά αναγνωρίζονται δύο βασικά μοτίβα. Έτσι, στην πλειοψηφία τους οι ασθενείς ακολουθούνε τη λεγόμενη υποτροπιάζουσα ή διαλείπουσα κλινική πορεία νόσου, που χαρακτηρίζεται από επεισόδια προσβολής του ΚΝΣ με την εμφάνιση των αντίστοιχων συμπτωμάτων ανάλογα με της θέση πρόκλησης βλάβης του ΚΝΣ, ακολουθούμενη συνήθως από

διαλείμματα ελεύθερης νόσου που χαρακτηρίζονται από ύφεση την κλινικής εικόνας. Στο μοτίβο αυτό, που είναι το συχνότερο και εμφανίζεται έως και στο 85% των περιπτώσεων, οι παροξύνσεις την νόσου μπορεί να διαρκούν από μερικές ημέρες μέχρι και μήνες, η έναρξη τους είναι συνήθως απρόβλεπτη και σπάνια συμβαίνουν με συχνότητα μεγαλύτερη από δύο φορές το χρόνο. Από την αντίπερα όχθη, ένα μικρότερο ποσοστό των ασθενών, που δε ξεπερνά το 10-15%, εμφανίζει εξαρχής προοδευτική νόσο, όπου οι περίοδοι πλήρους ανάκαμψης λείπουν και οι ασθενείς εμφανίζουν μία σταδιακά προοδευτική επιδείνωση. Συχνά όμως η κλινική πορεία είναι μικτή, με αποτέλεσμα έως και το 60% των ασθενών που αρχικώς εμφανίζουν υποτροπιάζουσα συμπτωματολογία, με το πέρασμα του χρόνου και με τη συσσώρευση βλαβών στο ΚΝΣ, θα μεταπέσουν σε μία κατάσταση με προοδευτική απώλεια λειτουργικότητας, χωρίς περιόδους ανάκαμψης, η οποία ονομάζεται δευτερογενώς προοδευτική νόσος [2, 6, 27].

4.3 Κλινικά Απομονωμένο Σύνδρομο

Ανεξάρτητα όμως της κλινικής πορείας που θα ακολουθήσει ο ασθενής, η έναρξη της νόσου ξεκινά συνήθως με το λεγόμενο “Κλινικά Απομονωμένο Σύνδρομο”, όπου προκαλείται μία αιφνίδια προσβολή της μυελίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας κλινικής εικόνας, αντίστοιχης με τη θέση όπου έχει γίνει η βλάβη, η οποία διαρκεί τουλάχιστον 24 ώρες. Σε αυτό το σημείο δεν υπάρχει ακόμη διάγνωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας καθώς μπορεί να αποτελεί μία παροδική κατάσταση. Όσοι ασθενείς τελικώς εμφανίζουν πολλαπλή σκλήρυνση παρουσιάζουν τη χαρακτηριστική εικόνα της νόσου κάποιο χρονικό διάστημα μετά το κλινικά απομονωμένο σύνδρομο, με το 45% να εμφανίζει κινητικές ή αισθητηριακές διαταραχές, το 20% οπτική νευρίτιδα, το 10% συμπτώματα εξαιτίας βλαβών στο εγκεφαλικό στέλεχος, ενώ ένα 25% μπορεί να εμφανίζει συνδυασμό των παραπάνω προβλημάτων [32].

5. Διάγνωση

Η υποψία της σκλήρυνσης κατά πλάκας βασίζεται στις κλινικές ενδείξεις και συμπτώματα με τη συμμετοχή του κινητικού, οπτικού, αισθητηριακού και αυτόνομου συστήματος. Η πέραν χωρίς αμφιβολία διάγνωση όμως για την πολλαπλή σκλήρυνση είναι αρκετά δύσκολη. Ουσιαστικά, σίγουρη διάγνωση μπορεί να γίνει μόνο όταν υπάρχουν αποδείξεις για τουλάχιστον δύο ανατομικά ξεχωριστά απομυελινωτικά γεγονότα που συμβαίνουν τουλάχιστον 30 ημέρες ξεχωριστά. Σκοπός είναι πάντα η σωστή και γρήγορη διάγνωση, με στόχο την έγκαιρη αντιμετώπιση ώστε να αποφευχθεί η πρόκληση νευρολογικής βλάβης που θα υπονομεύσει την καθημερινότητα του ασθενούς. Σε αρκετές περιπτώσεις τα κλινικά ευρήματα επαρκούν για την εγκατάσταση της διάγνωσης με αποτέλεσμα ο εργαστηριακό έλεγχος να φαντάζει περιττός. Με εξαίρεση όμως σημείο Lhermitte (που αναφέρεται στην αίσθηση ηλεκτρικού ρεύματος που διαπερνά τη σπονδυλική στήλη και φτάνει μέχρι τα άκρα με την κάμψη της κεφαλής) και του φαινομένου Uhthoff (παροδική επιδείνωση των συμπτωμάτων όταν αυξάνεται η θερμοκρασία του σώματος, όπως μετά από άσκηση ή ζεστό μπάνιο), πολύ λίγα κλινικά χαρακτηριστικά είναι ειδικά μόνο για τη συγκεκριμένη νόσο και αρκετές είναι οι περιπτώσεις όπου η διάγνωση είναι ασαφής [1]. Για τον παραπάνω λόγο, η διάγνωση πέραν της κλινικής εικόνας συχνά απαιτεί τη συμβολή εργαστηριακών και απεικονιστικών ευρημάτων, όπως άλλωστε περιγράφεται στα κριτήρια ΜακΝτόναλντ [33] που αποτελούν την πιο διαδεδομένη μέθοδο διάγνωσης, η οποία συμπεριλαμβάνει και τα 3 στοιχεία (κλινικά, εργαστηριακά, απεικονιστικά) και τα εξετάζει στο χρόνο.

Χαρακτηριστικό όμως της σημερινής εποχής είναι ότι δίνεται όλο και περισσότερο βάρος στα απεικονιστικά ευρήματα, καθώς η προσθήκη της μαγνητικής τομογραφίας εγκεφάλου στο διαγνωστικό ροστερ, μας δόθηκε η δυνατότητα να αναδεικνύουμε τις απομυελινωτικές εστίες με ιδιαίτερη ευαισθησία [34, 35]. Μάλιστα με τη χορήγηση γαλοδινίου, ενός ενδοφλέβιου παραμαγνητικού υλικού, οι πιο πρόσφατες ή ενεργείς βλάβες αναδεικνύονται καλύτερα και μπορούν να διακριθούν από τις παλιότερες.

Παράλληλα η διάγνωση συμπληρώνεται με τον υπόλοιπο παρακλινικό έλεγχο όπου περιλαμβάνονται τα προκλητά δυναμικά, ιδίως για εντόπιση βλάβης στο οπτικό νεύρο [36] και η οσφυο-νωτιαία παρακέντηση με τη λήψη εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Η λήψη εγκεφαλονωτιαίου μπορεί να συνεισφέρει στον καλύτερο χαρακτηρισμό της νόσου, να

αναγνωρίσει στοιχεία φλεγμονής και να αποκλείσει την παρουσία άλλων νοσημάτων όπως λοιμώξεων του ΚΝΣ. Επίσης, ηλεκτροφόρηση του εγκεφαλονωτιαίου μπορεί να δείξει την ύπαρξη ολιγοκλωνικών IgG ζωνών οι οποίες συναντώνται στο 75%-85% των ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας [37].

6. Θεραπεία

Η θεραπευτική στρατηγική στην αντιμετώπιση των ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας, πρέπει να εκπληρώνει δύο στόχους. Ο πρώτος είναι η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων και η γρήγορη βελτίωση της λειτουργικότητας μετά από μία κρίση, ώστε να είναι σε θέση ο ασθενής να επανέλθει στην καθημερινότητα του. Ο δεύτερος στόχος αποβλέπει μακροπρόθεσμα και είναι η πρόληψη των μελλοντικών κρίσεων ώστε να προληφθεί ή να καθυστερήσει τη συσσώρευση βλαβών στο νευρικό ιστό που θα οδηγήσει στην προοδευτική νόσο και στην εγκατάσταση αναπηρίας [1, 2]. Σημαντική θεωρείται επίσης η αντιμετώπιση ασθενών με κλινικά απομονωμένο σύνδρομο, καθώς δίνεται η δυνατότητα να καθυστερήσει ή ακόμη και να αποφευχθεί η μετατροπή σε πολλαπλή σκλήρυνση. Από την άλλη μεριά, τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα συχνά δεν είναι αποτελεσματικά και φέρουν αρκετές παρενέργειες.

6.1 Αντιμετώπιση Συμπτωμάτων

Θεραπείες που μπορούν να ανακουφίσουν προσωρινά τα συμπτώματα περιλαμβάνουν κυρίως τη χρήση κορτικοστεροειδών, όπως η μεθυλπρεδνιζολόνη και τη πλασμαφαίρεση. Οι θεραπείες αυτές είναι αρκετά αποτελεσματικές, πέραν όμως της βραχυπρόθεσμης ανακούφισης που προσφέρουν δεν φαίνεται να συμβάλλουν σημαντικά στη μακροπρόθεσμα αναστέλλοντας την πορεία της νόσου.

6.2 Τροποποιητικά της Νόσου Φάρμακα

Όσων αφορά την μακροχρόνια αντιμετώπιση, η αποτελεσματικότητα των σημερινών θεραπειών ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο και την πορεία της νόσου. Επιπλέον, οι βασικές κλινικές δοκιμές που έχουν οδηγήσει στην έγκριση των περισσότερων αγωγών που χρησιμοποιούνται σήμερα ήταν σχετικά μικρές, με λίγους δηλαδή ασθενείς και βραχείας διάρκειας (2-3 χρόνια), με αποτέλεσμα η μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητα να μην είναι εύκολο να καθοριστεί.

Οι ιντερφερόνες τύπου 1 χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1970, με το σκεπτικό ότι η αντι-ϊική τους δράση μπορεί να αντιμετωπίσει τους λοιμογόνους παράγοντες που πιθανώς να συμβάλλουν στην εκδήλωση της νόσου. Αντιθέτως με την

ιντερφερόνη-γ η οποία μπορεί αν προκαλέσει υποτροπές της νόσου, η ιντερφερόνη β έχει φανεί να μειώνει τη συχνότητα τους. Για το λόγο αυτό και επειδή η ιντερφερόνη-β έχει ένα σχετικά αβλαβές προφίλ ανεπιθύμητων παρενεργειών, η χρήση της επεκτάθηκε και σε πιο αρχικά στάδια της νόσου.

Τη δεκαετία του 1980-90 μελετήθηκαν κλασικές ανοσοκατασταλτικές θεραπείες, όπως η κυκλοσπορίνη και η κυκλοφωσφαμίδη, με αρνητικά όμως αποτελέσματα. Τα ευρήματα αυτά πιθανώς αντικατοπτρίζουν την μη ανταπόκριση στη θεραπεία ασθενών με προοδευτική νόσο, που τώρα γνωρίζουμε ότι προκαλείτε σε μεγάλο βαθμό από μη φλεγμονώδεις μηχανισμούς, παρά την αποτυχία των θεραπειών να καταστείλουν τη φλεγμονή.

Ένα ακόμη φάρμακο που θεωρείται ότι προκαλεί ανοχή ή αεργία των αυτό-αντιδραστικών, έναντι στη μυελίνη λεμφοκυττάρων είναι η οξείκη γλατιραμέρη. Τόσο η ιντερφερόνη-β όσο και η οξείκη γλατιραμέρη, έχοντας δείξει μέτρια αποτελεσματικότητα με μείωση της συχνότητας των υποτροπών περίπου κατά 30% στα πρώτα 2 με 3 χρόνια, θεωρούνται φάρμακα πρώτης γραμμής για την υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα πολλαπλή σκλήρυνση και χρησιμοποιούνται συνεχώς στην καθ' ημέρα κλινική πράξη. Μάλιστα, έχει φανεί ότι η χρήση ιντερφερόνης μπορεί να μειώσει το ρυθμό μετατροπής του κλινικά απομονωμένου συνδρόμου σε πολλαπλή σκλήρυνση από 45%-50% σε 28%-35%.

Καμία από τις παραπάνω θεραπείες όμως δεν είναι αποτελεσματική στο προοδευτικό στάδιο της νόσου. Επιπλέον, κανένας θεραπευτικός παράγοντας δεν έχει φανεί να επηρεάζει την προϊούσα προοδευτική νόσο. Οι κύριες ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση της ιντερφερόνης είναι τοπικός ερεθισμός στη θέση της ένεσης και πρόκληση συμπτωμάτων γρίπης. Σε ένα 5%-30% των ασθενών αναφέρεται η ανάπτυξη εξουδετερωτικών αντισωμάτων τον πρώτο χρόνο από την έναρξη της ιντερφερόνης, γεγονός που επηρεάζει το θεραπευτικό αποτέλεσμα [1].

6.3 Βιολογικοί & Αντινεοπλασματικοί Παράγοντες

Επί αποτυχίας των προαναφερθέντων θεραπειών έχει πάρει έγκριση η μιτοξανδρόνη. Η μιτοξανδρόνη αποτελεί ένα αντι-νεοπλασματικό παράγοντα και θεωρείται ότι είναι πιο αποτελεσματική από την ιντερφερόνη και την οξείκη γλατιραμέρη στη μείωση της

συχνότητας των υποτροπών της νόσου. Ωστόσο η χρήση της περιορίζεται μόνο για ιδιαίτερα επιθετική νόσο λόγω της μεγάλης τοξικότητας που φέρει, όπως συσσωρευτική καρδιο-τοξικότητα και οξεία λευχαιμία. Παρομοίως, ούτε αυτός ο παράγοντας είναι αποτελεσματικός στην μη υποτροπιάζουσα-προϊούσα προοδευτική νόσο. Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και συγκεκριμένα του natalizumab (Tysabri) περιορίζεται μόνο για μονοθεραπεία σε σοβαρή υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα νόσο, καθώς παρά την αυξημένη αποτελεσματικότητα, έχουν αναφερθεί περιστατικά προοδευτικής πολύ-εστιακής λευκο-εγκεφαλοπάθειας μετά από συγχορήγηση του με ιντερφερόνη [1].

7. Πρόγνωση

Η πορεία της νόσου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το φύλο, η ηλικία του ατόμου, τα αρχικά συμπτώματα, η συχνότητα των υποτροπών και ο βαθμός αναπηρίας. Η υποκατηγορία της νόσου που σχετίζεται με την συχνότητα υποτροπών είναι αρκετά ενδεικτική ως προς την πορεία που θα ακολουθήσει ο άρρωστος. Γενικώς το γυναικείο φύλο, η μικρή ηλικία κατά την έναρξη της νόσου, η εμφάνιση οπτικής νευρίτιδας, η υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα κατηγορία με λιγότερη συχνότητα κρίσεων, ιδίως τα πρώτα έτη, σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση [38]. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών (έως και 90%) διατηρεί την ικανότητα να περπατά και 10 χρόνια μετά την έναρξη της νόσου, οι περισσότεροι όμως εμφανίζουν αυξημένη αναπηρία προς το τέλος. Το μέσο προσδόκιμο ζωής είναι 30 χρόνια μετά την έναρξη της νόσου και 5 έως 10 χρόνια χαμηλότερο από άτομα που δεν νοσούν. Ο θάνατος της περισσότερες φορές σχετίζεται με επιπλοκές της νόσου, ενώ δεν είναι και λίγες οι περιπτώσεις αυτοκτονίας [1, 38].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II. *BAFF-BAFFR* Οδός Σηματοδότησης

1. Ο Συνδέτης

Ο ενεργοποιητικός παράγοντας των λεμφοκυττάρων (BAFF, B-cell activating factor), επίσης γνωστός ως BlyS, TALL-1, THANK, TNF13B ή zTNF4 [39-41] ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών λύσης του όγκου (tumor necrosis factor-TNF). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται κυρίως από κύτταρα της μυελικής σειράς, όπως είναι τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα [39-44]. Η παραγωγή και απελευθέρωση του BAFF ρυθμίζεται από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως οι ιντερφερόνες τύπου 1 και η IL-10 [41, 43]. Το μόριο του BAFF υπάρχει σαν μία όμοιο-τριμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη, δηλαδή μία πρωτεΐνη με τρία ίδια μέρη, μπορεί όμως αν υπάρξει και σε διαλυτή μορφή ύστερα από πέψη και αποκοπή από την κυτταρική μεμβράνη μέσω πρωτεασών τύπου φουρίνης [41-43, 45]. Αν και η βιολογικά αναγκαία δραστική της μορφή είναι η τριμερής, έχει εντοπιστεί και σε εξηνταμερή (είκοση τριμερή) μορφή σωματιδίων που προσομοιάζουν με ιό. Ένας τριμερής συνδέτης όπως ο BAFF, πρέπει να συνδεθεί με 3 διαφορετικούς υποδοχείς για να μεταδώσει το σήμα [46].

Παραδοσιακά ο βιολογικός ρόλος του BAFF σχετίζεται με την ομοιόσταση των B-κυτταρικών πληθυσμών της οριακής ζώνης και των λεμφοζιδίων, των ώριμων δηλαδή B-κυτταρικών πληθυσμών στην περιφέρεια [40, 41, 43], καθώς φαίνεται να παρατείνει την επιβίωση τους [43]. Διαγονιδιακή ή εξωγενής χορήγηση BAFF έχει την ικανότητα να επεκτείνει αυτούς τους B-κυτταρικούς πληθυσμούς, ενώ οι ίδιοι πληθυσμοί μειώνονται αισθητά εάν η δραστηριότητα του BAFF παρεμποδιστεί με στοχευμένες γονιδιακές μεταλλάξεις, εξουδετερωτικά αντισώματα ή υποδοχείς “δολώματα” [41]. Επίσης έχει παρατηρηθεί πλήρης κατάρρευση του υποσυνόλου των ώριμων B-κυτταρικών πληθυσμών στην περιφέρεια μόλις 2 με 4 εβδομάδες μετά την αδρανοποίηση του BAFF σε ενήλικα πειραματόζωα [43]. Αυτός ο ρυθμός αποσύνθεσης φαίνεται πολύ γρήγορος για να εξηγηθεί απλώς εξαιτίας της μειωμένης προσφοράς νεοσχηματισμένων B κυττάρων, γεγονός που υποστηρίζει αυτό που επισημάνουν και άλλες μελέτες, ότι δηλαδή τα ώριμα B κύτταρα απαιτούν BAFF

σηματοδότησή για την επιβίωση τους [43]. Αντιθέτως, η επιβίωση των ανώριμων B1 κυττάρων στον μυελό των οστών δεν εξαρτάτε από το σηματοδοτικό μονοπάτι του BAFF όπως οι ώριμοι B-κυτταρικοί πληθυσμοί στην περιφέρεια, γεγονός που αποδεικνύεται με την παρουσία των B1-κυττάρων σε φυσιολογικές ποσότητες σε ποντίκια που έχουν πλήρη έλλειψη έκφρασης του BAFF ή σε όσα υποβλήθηκαν σε αγωγή με BAFF αναστολείς [40, 41, 43]. Εκτός όμως από την σημασία του για του B-κυτταρικούς πληθυσμούς, πρόσφατα φάνηκε ότι ο συγκεκριμένος συνδέτης μπορεί να λειτουργήσει και ως ένας αποτελεσματικός συν-διεγέρτης των T-λεμφοκυττάρων [47, 48].

Μέχρι και σήμερα υποστηρίζεται ότι η λειτουργία του BAFF μεσολαβεί διαμέσου τριών υποδοχέων που απαντώνται στα B-κύτταρα. Αυτοί οι υποδοχείς είναι: το αντιγόνο ωρίμανσης των B-κυττάρων (BCMA- B cell maturation antigen), ο διαμεμβρανικός ενεργοποιητής με αλληλεπίδραση συνδέτη κυκλοφιλίνης (TACI-transmembrane activator and cytophilin ligand interactor) και ο υποδοχέας του παράγοντα ενεργοποίησης των B-κυττάρων (BAFFR- B cell activating factor receptor) [41, 43, 46, 49]. Αν και ο BAFF εμφανίζει συγγένεια και για τους τρεις υποδοχείς, η φυσιολογική ωρίμανση των B-κυτταρικών πληθυσμών που παρατηρείται σε ποντίκια που δεν εκφράζουν τους υποδοχείς BCMA και TACI, υποδηλώνει ότι η πιθανότητα αυτών των δύο υποδοχέων να είναι αναντικατάστατοι για την συγκεκριμένη λειτουργία είναι αρκετά μικρή [43]. Επιπλέον, οι B κυτταρικοί πληθυσμοί των λεμφοζιδίων και της οριακής ζώνης μειώνονται σε μεγάλο βαθμό μετά από μία στοχευμένη μετάλλαξη του απενεργοποιεί τον BAFFR [41], που σημαίνει ότι ο BAFFR είναι ο αναγκαίος υποδοχέας που μεταβιβάζει τα απαραίτητα σήματα για τη διατήρηση των B-κυτταρικών πληθυσμών στην περιφέρεια [41, 43].

2. Ο Υποδοχέας

Ο BAFFR επίσης γνωστός ως BR3 και TNFRSF13C είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III, που αποτελείται από 184 αμινοξέα. Αντιστοίχως με τον BAFF, ο BAFFR ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα λύσης όγκων (TNFR-tumor necrosis factor receptor). Στην ίδια ομάδα υποδοχέων ανήκει ο BCMA και ο TACI [39, 40, 50, 51]. Ο BAFFR εκφράζεται κατά κύριο λόγο στην επιφάνεια των ώριμων Β-λεμφοκυττάρων [46]. Η έκφρασή του στα νέο-σχηματισμένα, ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα είναι χαμηλή, όμως αυξάνεται καθώς αυτά τα κύτταρα προχωρούν μέσω των σταδίων της ωρίμανσης Β κυττάρων [46]. Έχει βρεθεί ότι ακόμη και τα Τ-λεμφοκύτταρα μπορούν να αυξήσουν την έκφραση του BAFFR μετά από ενεργοποίηση τους, ενώ τα Τ-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα εμφανίζουν μία βασική έκφραση του υποδοχέα [46, 47].

Σε αντίθεση με τα άλλα μέλη των TNF υποδοχέων, ο BAFFR φέρει μόνο μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη η οποία είναι αποκομμένη έχοντας μόνο 4 κατάλοιπα κυστεΐνης, τα οποία ενώνονται με 2 δισουλφιδικούς δεσμούς [39, 40, 42, 49, 52]. Η κριτική αλληλουχία για τη σύνδεση με το BAFF εντοπίζεται στην εξωκυττάρια περιοχή και χαρακτηρίζεται από την εξής αλληλουχία αμινοξέων ²⁶DLLVRH³¹. Έχει αποδειχθεί ότι αυτή η μικρή αλληλουχία είναι ικανή για πλήρη σύνδεση με τον συνδέτη, γεγονός που μπορεί να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά. Παρόμοια μοτίβα σε έκταση και λειτουργικότητα, αλλά όχι με πανομοιότυπη αλληλουχία φέρουν και οι άλλοι 2 υποδοχείς του BAFF [42].

Χαρακτηριστικό είναι ότι η Β-περιφερική λεμφοπενία που παρατηρείται στα A/WySN ποντίκια [43] προκαλείται από μία μετάλλαξη στο εξόνιο 3 του γονιδίου του BAFFR, που επηρεάζει την ενδοκυττάρια περιοχή σηματοδότησης του υποδοχέα [40, 41, 43]. Ο φαινότυπος που προκύπτει προσομοιάζει εκείνο των ποντικίων που δεν εκφράζουν καθόλου BAFF [39, 41, 42, 49], αν και λίγο πιο ήπιος [40]. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι μόνο ο BAFFR μεταδίδει τα κρίσιμα σήματα επιβίωσης που σχετίζονται με τη διέγερση από το BAFF [40, 42, 43]. Επιπλέον, αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ ο BAFF μπορεί και προσδένεται σε διαφορετικούς υποδοχείς και ότι στην ουσία μοιράζεται τον BCMA και τον TACI με τον APRIL, ο BAFFR συνδέεται αποκλειστικά μόνο με τον BAFF [40, 43]. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι

η αλληλεπίδραση BAFF-BAFFR είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την επιβίωση περιφερικών B κυτταρικών πληθυσμών [40, 41, 43, 46].

Χαρακτηριστικό της οικογένειας των υποδοχέων του TNF είναι ότι αυτοί οι υποδοχείς δεν δουλεύουν μόνοι τους, αλλά πρέπει να ολιγομεριστούν με άλλα μονομερή του ίδιου υποδοχέα για τη μεταβίβαση του σήματος. Επομένως, κριτικής σημασίας βήμα για τη λειτουργία αυτών των υποδοχέων είναι η συνάθροιση τους, προτού ακόμη έρθουν σε επαφή με τον συνδέτη [52]. Παρομοίως η λειτουργία του BAFFR εξαρτάτε από τον ολιγομερισμό του υποδοχέα. Λαμβάνοντας τώρα υπόψη ότι ο συνδέτης, ο BAFF, είναι μία ομο-τριμερής πρωτεΐνη, τα μονομερή του υποδοχέα θα πρέπει να τριμεριστούν για να πραγματοποιηθεί η σύνδεση.

3. Οι Μεταλλάξεις

Το γονίδιο του BAFFR εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 22 και συγκεκριμένα στη θέση 22q13.1-13.31 [40] και αποτελείται από 3 εξόνια [39]. Γενετική ανάλυση του γονιδίου του υποδοχέα έχει αποκαλύψει μία ευρεία ποικιλία αλληλομόρφων [39, 53, 54] με τους πολυμορφισμούς rs77874543 (P21R) [55] και rs61756766 (H159Y) [56] να είναι οι πιο συχνά συσχετιζόμενοι με παθολογικές καταστάσεις.

3.1 P21R

Ο P21R πολυμορφισμός προκύπτει από μία αντικατάσταση βάσης, κυτοσίνη σε γουανίνη (C → G), στο κωδικόνιο 22 του 1^{ου} εξονίου. Η αντικατάσταση αυτή οδηγεί σε μία αλλαγή του αμινοξέος προλίνη σε αργινίνη με αποτέλεσμα να επηρεάζει την εξωκυττάρια δομή του υποδοχέα, η οποία ευθύνεται για τη σύνδεση με το BAFF [39, 55].

Χαρακτηριστικό της παρούσας μετάλλαξης είναι ότι παρεμποδίζει την προσυναρμολόγηση του BAFFR σε πολυμερή σύμπλοκα. Όπως αναφέραμε προηγουμένως η συνάθροιση των υποδοχέων της οικογένειας του TNF στην οποία ανήκει ο BAFFR, είναι πολύ σημαντική για τον μετέπειτα πολυμερισμό τους και σύνδεση με τον συνδέτη. Επιπλέον, ο BAFF ως ένας συνδέτης αποτελούμενος από τρία ισομερή πρέπει να συνδεθεί με 3 διαφορετικούς υποδοχείς για να μεταδώσει το σήμα [46]. Καθώς όμως απαιτούνται περισσότεροι του ενός υποδοχέα, το σύστημα είναι ευαίσθητο στην κυρίαρχη επίδραση της μετάλλαξης, που σημαίνει ότι ακόμη και ετεροζυγότες θα εμφανίσουν μειωμένης δυναμικότητας σύνδεση με τον BAFF που θα οδηγήσει σε περιορισμένη ενεργοποίηση του NF-κΒ2 [52]. Η υπόθεση αυτή έχει αποδειχθεί σε μελέτες σύνδεσης όπου παρατηρήθηκε ότι κύτταρα που εκφράζουν ομόζυγα ή ετερόζυγα τον υποδοχέα για την P21R μετάλλαξη εμφανίζουν παρομοίως περιορισμένη σύνδεση με τον BAFF, ενώ η έκφραση του BAFFR δεν επηρεάζεται [52]. Παρά όμως την έως και 50% μειωμένη δραστηριότητα σύνδεσης που παρατηρήθηκε σε αυτές τις μελέτες, σε άτομα που έφεραν τον P21R πολυμορφισμό, ο πληθυσμός των B κυττάρων δεν επηρεάστηκε, αλλά παρέμεινε ο ίδιος και σε αριθμό και σε σύνθεση, επισημαίνοντας ότι η ύπαρξη της μετάλλαξης από μόνη της δεν επαρκεί για να καθορίσει τον φαινότυπο [52].

3.2 H159Y

Ο H159Y πολυμορφισμός αναφέρεται σε μία αντικατάσταση βάσης, κυτοσίνης σε θυμίνη (C → T) στο κωδικόνιο 159 που βρίσκεται στο 3^ο εξόνιο. Η αντικατάσταση αυτή οδηγεί σε μία αλλαγή του αμινοξέος ισταμίνη σε τυροσίνη, με αποτέλεσμα να επηρεάζει την ενδοκυττάρια περιοχή σηματοδότησης του υποδοχέα [39, 56]. Η μετάλλαξη αυτή θεωρείται ότι προκαλεί ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης και για το λόγο αυτό σχετίζεται με λεμφο-υπερπλαστικά φαινόμενα. Πιο συγκεκριμένα έχει εντοπιστεί ότι η σηματοδότηση μέσω της συγκεκριμένης παραλλαγής του BAFFR οδηγεί σε αυξημένη στρατολόγηση των TRAF 2, 3 και 6, με αποτέλεσμα αυξημένη δραστηριότητα των NP-κΒ1 και NP-κΒ2 [57]. Σε περίπτωση παρουσίας και των δύο μεταλλάξεων εικάζεται ότι ο H159Y πολυμορφισμός ίσως έχει την ικανότητα να αντισταθμίσει την κατασταλτική επίδραση της P21R μετάλλαξης στο σηματοδοτικό μονοπάτι.

3.3 Κλινική Σημασία

Τόσο η P21R μετάλλαξη, όσο και η H159Y έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη του P21R πολυμορφισμού σε άτομα με σύνδρομο πρωτοπαθούς ανεπάρκειας αντισωμάτων και κοινή-ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID-common variable immunodeficiency) και έχει συσχετιστεί με το φαινότυπο της νόσου [39, 51, 52, 58, 59]. Παρομοίως, ο H159Y πολυμορφισμός θεωρείται ότι συμβάλει στην εμφάνιση διάφορων λεμφο-υπερπλαστικών συνδρόμων, όπως η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, διάφορους τύπους non-Hodgkin λεμφώματος, αλλά και τα λεμφο-υπερπλαστικά σύνδρομα που μπορούν να εμφανιστούν σε ασθενείς με νόσο Sjogren [44, 57, 60, 61]. Παρόλα αυτά, αυτοί οι δύο πολυμορφισμοί έχουν παρατηρηθεί και σε υγιείς ανθρώπους, που σημαίνει ότι η ύπαρξη και μόνο αυτών των αλληλόμορφων δεν είναι ικανή από μόνη της να καθορίσει τον κλινικό φαινότυπο [39, 58].

4. Η Σχέση με την Πολλαπλή Σκλήρυνση

Ένα υποσχόμενο πεδίο έρευνας αποτελεί ο δυνητικός ρόλος του BAFF στην σκλήρυνση κατά πλάκας [62]. Διάφορες αναφορές μέχρι στιγμής έχουν στηρίξει την υπόθεση ότι υπερέκφραση του BAFF συμβάλει καθοριστικά στην εμφάνιση αυτό-ανοσίας [43, 44, 47]. Για παράδειγμα, αυξημένη έκφραση του BAFF σε πειραματόζωα έχει ως αποτέλεσμα να αναπτύξουν αυτοάνοσα συμπτώματα που μοιάζουν με εκείνα του συστηματικού ερυθματώδους λύκου (ΣΕΛ). Επιπλέον, έχουν ανιχνευθεί αυξημένα επίπεδα του BAFF σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με αυτοάνοσες νόσους όπως ο ΣΕΛ και το σύνδρομο Sjögren [47]. Συγκεκριμένα στη σκλήρυνση κατά πλάκας, τα επίπεδα mRNA του BAFF εμφανίζονται υψηλότερα στον ορό των ασθενών σε σχέση με τους υγιείς [63]. Επίσης ο BAFF ανιχνεύεται στις απομυελινωτικές εστίες της νόσου [46, 64]. Τέλος αρκετές είναι οι αναφορές που συσχετίζουν τα επίπεδα του BAFF στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών με πιο σοβαρή νόσο [65-67].

Το ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί είναι πως εμφανίζεται ο BAFF στο ΚΝΣ, με ποιο τρόπο μπορεί να συμβάλει στη νόσο και ποια η σχέση του υποδοχέα (BAFFR).

4.1 Έκφραση BAFF στο ΚΝΣ

Όπως ήδη γνωρίζουμε ο συνδέτης αυτός παράγεται κυρίως από κύτταρα της μυελώδους σειράς. Η έκφρασή του όμως έχει εντοπιστεί και σε άλλα κύτταρα, μεταξύ των οποίων είναι τα αστροκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από μακροφάγα τα οποία έχουν μεταναστεύσει στο ΚΝΣ, εκεί διαφοροποιούνται σε αστροκύτταρα όπου αποτελούν συστατικά της νευρογλοίας. Ενεργοποιημένα αστροκύτταρα που εκφράζουν BAFF έχουν βρεθεί σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας, αλλά και σε άλλα νοσήματα του ΚΝΣ, όπως σε λεμφώματα και σε ποντίκια που μολυνθήκαν πειραματικά με κυτταρομεγαλοϊό [44, 46].

4.2 Σημασία BAFF υπερέκφρασης

Η παρουσία όμως του BAFF στο ΚΝΣ μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις. Παρά το γεγονός ότι ο BAFF είναι ένας σημαντικός παράγοντας που προωθεί την ωρίμανση των Β-κυττάρων και παρατείνει την επιβίωση τους, αυξημένη παραγωγή BAFF είναι σε θέση να υπονομεύσει την Β-κυτταρική ανοχή [43], δίνοντας για παράδειγμα ευκαιρία για επιβίωση σε αυτό-αντιδραστικά Β-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον η εξωγενής χορήγηση BAFF, έχει φανεί ότι μπορεί να ενισχύσει τις Β-κυτταρικές απαντήσεις τόσο αυτές που είναι εξαρτημένες από Τ-κύτταρα όσο και τις ανεξάρτητες [43]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα TACI ανεπαρκή ποντίκια έχουν ελαττωμένες Τ-ανεξάρτητες Β-κυτταρικές απαντήσεις εικάζεται ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση ο υποδοχέας υπεύθυνος για τις ενισχυμένες Β-κυτταρικές απαντήσεις, είναι ο TACI και όχι ο BAFFR [43]. Η δράση του BAFF σε άλλους υποδοχείς πέραν του BAFFR είναι μείζονας σημασίας, ιδίως σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ελαττωμένη ικανότητα σύνδεσης του BAFF με τον κύριο υποδοχέα του (δηλαδή τον BAFFR) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα υπερέκφραση του BAFF [68]. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η έως και 50% ελάττωση του βαθμού σύνδεσης BAFF-BAFFR στην P21R μετάλλαξη δεν συνοδεύεται από αλλαγές στον αριθμό και σύνθεση των Β-κυτταρικών πληθυσμών, η υπερέκφραση του BAFF μέσω της δράσης του σε άλλους υποδοχείς μπορεί να έχει επιζήμιες επιπτώσεις, όπως ενίσχυση των Τ-ανεξάρτητων Β-κυτταρικών απαντήσεων από διέγερση του TACI.

Ο πιθανός ρόλος του BAFF στην πρόκληση αυτό-άνοσης βλάβης, είτε μέσα από την ενίσχυση των Β-κυτταρικών απαντήσεων, είτε λόγω της επιβίωσης των αυτό-αντιδραστικών κυττάρων, ή μέσω κάποιου άλλου αυτό-άνοσου μηχανισμού δεν αποτελεί τη μοναδική παθογενετική εξήγηση για την παρουσία του σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας. Διότι υπάρχουν πλέον δεδομένα που υποστηρίζουν ότι ο BAFF μπορεί να συμβάλει στην εκφύλιση του νευρικού ιστού. Όπως αναφέραμε προηγουμένως, ο BAFF παραδοσιακά συνδέεται και μεταδίδει σήματα με 3 υποδοχείς: τον BAFFR, τον BCMA και τον TACI. Ωστόσο πρόσφατα ανιχνεύθηκε ένας νέος υποδοχέας που εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τον BAFF. Ο υποδοχέας αυτός ονομάζεται Nogo 66 (NgR) και εκφράζεται στους νευρώνες. Σύνδεση του BAFF στον NgR έχει ως αποτέλεσμα τη μετάδοση σήματος που μπορεί να αναστείλει τη ανάπτυξη των νευρώνων [44, 69]. Η σχέση αυτή παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον σε τραυματικούς του ΚΝΣ και νόσους όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας [44, 64], καθώς η

υπερέκφραση του BAFF θα μπορούσε να προωθήσει την νευρο-εκφύλιση, είτε εξαιτίας γενικότερης καταστολής της νευρικής ανάπτυξης, είτε συγκεκριμένα λόγω αδυναμίας ανάπτυξης των βλαβών που έχουν υποστεί οι νευράξονες μετά από παροξυσμούς της πολλαπλής σκλήρυνσης.

4.3 Σημασία των μεταλλάξεων του υποδοχέα στην σκλήρυνση κατά πλάκας.

Όπως ήδη περιγράψαμε η ύπαρξη της P21R μετάλλαξης έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία πολυμερισμού του υποδοχέα, οδηγώντας σε μειωμένη έως και κατά 50% σύνδεση του BAFFR με τον BAFF [52, 58]. Όμως η μειωμένη δραστηριότητα σύνδεσης του υποδοχέα δεν μεταφράστηκε από ανάλογη μείωση των B-κυτταρικών πληθυσμών. Παρόλα αυτά εικάζουμε ότι η αδυναμία σύνδεσης μπορεί να οδηγήσει σε υπερέκφραση του BAFF. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στην αναφορά μιας πρόσφατης μελέτης που υποστηρίζει ότι οι βασικές συστηματικές συγκεντρώσεις του BAFF εξαρτώνται από τη δυνατότητα σύνδεσης του μορίου με τους υποδοχείς του και ιδιαίτερα με τον BAFFR [68]. Η προαναφερθείσα μελέτη συσχέτισε επίσης τις αυξημένες συγκεντρώσεις του BAFF με τον μειωμένο αριθμό B λεμφοκυττάρων που οδηγεί σε ελάττωση του αριθμού του BAFFR. Παρόλα αυτά, η μείωση των θέσεων πρόσδεσης για τον BAFF θα μπορούσε να είναι λειτουργική και όχι απόλυτη, όπως με την περίπτωση της P21R μετάλλαξης.

Παράδειγμα της σημασίας που μπορεί να έχει η λειτουργική ανεπάρκεια του BAFFR αποτελεί μία πρόσφατη μελέτη του Kim et al [70] όπου ποντίκια με πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα χρησιμοποιήθηκαν για να προσομοιάσουν την σκλήρυνση κατά πλάκας. Στη μελέτη αυτή τα ποντίκια ήταν μεταλλαγμένα και τους έλλειπε η έκφραση του BAFFR. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι τα ποντίκια αυτά εμφάνιζαν αυξημένες συγκεντρώσεις του BAFF τόσο συστηματικά όσο και στο ΚΝΣ. Μάλιστα τα BAFFR-ανεπαρκή ποντίκια παρουσίαζαν ένα φαινότυπο με ταχύτερη έναρξη την νόσου και πιο διάσπαρτη φλεγμονή στο νωτιαίο μυελό, παρά τον ελαττωμένο αριθμό ώριμων B-λεμφοκυττάρων. Εικάζεται ότι ο συγκεκριμένος δυσμενής φαινότυπος, που φαίνεται να σχετίζεται με τη λειτουργική ανεπάρκεια του BAFFR, μπορεί να προκύπτει από την αυξημένη δραστηριότητα BAFF σε άλλους υποδοχείς, είτε προωθώντας φλεγμονώδεις κυτταρικές απαντήσεις [48, 70], είτε

προωθώντας την εκφύλιση του νευρικού ιστού με απευθείας σύνδεση στον πρόσφατα ανακαλυφθέν NgR [69].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ-Πειραματικό Μέρος

1. Υλικά & Μέθοδοι

1.1 Σκοπός Μελέτης

Στην παρούσα μελέτη υπό το φως νέων δεδομένων που υποστηρίζουν πιθανή ρύθμιση της έκφρασης του BAFF από τη σύνδεση του με τον BAFFR και λαμβάνοντάς υπόψη την δράση του BAFF στον NgR, καθώς και τη συμβολή του στην εμφάνιση αυτό-ανοσίας, επιδιώξαμε να διερευνήσουμε εάν διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά της σκλήρυνσης κατά πλάκας επηρεάζονται από τη παρουσία μεταλλάξεων στον BAFFR και συγκεκριμένα από την P21R και H159Y μετάλλαξη.

1.2 Πληθυσμός Μελέτης

Το δείγμα της μελέτης αποτελείται από 517 διαδοχικούς ασθενείς που διαγνώστηκαν με σκλήρυνση κατά πλάκας και αντιμετωπίζονται στη Νευρολογική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας. Όλοι οι ασθενείς εκπλήρωσαν τα αναθεωρημένα διαγνωστικά κριτήρια του ΜακΝτοναλντ του 2010 για την πολλαπλή σκλήρυνση [33] και τα πρόσφατα διαγνωστικά κριτήρια για τη μαγνητική τομογραφία “MAGNIMS” [34]. Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από 316 υγιή άτομα που αναλύθηκαν προηγουμένως [54] για την επικράτηση των προαναφερθέντων πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό. Όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη έδωσαν τη συγκατάθεση τους ύστερα από ενημέρωση. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου στην πόλη της Λάρισας.

Για κάθε ασθενή με σκλήρυνση κατά πλάκας που συμμετείχε στην μελέτη εξήχθησαν πληροφορίες σχετικά με το φύλλο, την ηλικία έναρξης την νόσου, τη χρονική διάρκεια την νόσου, καθώς και χαρακτηριστικά που έχουν να κάνουν με την επιβάρυνση και τη σοβαρότητα της νόσου. Η επιβάρυνση της νόσου εκτιμήθηκε σύμφωνα την διευρυμένη κλίμακα αναπηρίας (Expanded Disability Status Scale-

EDSS) [71]. Η βαρύτητα της νόσου εκτιμήθηκε σύμφωνα με τον βαθμό βαρύτητας της πολλαπλής σκλήρυνση (Multiple Sclerosis Severity Score-MSSS) [72, 73]. Η ανάλυση της βαρύτητας της νόσου συνιστάται να γίνεται σε 3 τρείς κατηγορίες [74]: ασθενείς με χαμηλή βαρύτητα νόσου (καλοήθη ΠΣ), έναντι ασθενών με μέτρια βαρύτητα, έναντι ασθενών με σοβαρού βαθμού ΠΣ. Επομένως οι ασθενείς χωρίστηκαν και αναλύθηκαν σε αυτές τις τρείς κατηγορίες σύμφωνα με τη βαθμολογία που συγκέντρωσαν:

- Καλοήθη σκλήρυνση κατά πλάκας → MSSS score: 0-1,999
- Μέτριας βαρύτητας σκλήρυνση κατά πλάκας → MSSS score: 2-6,999
- Σοβαρού βαθμού σκλήρυνση κατά πλάκας → MSSS score: 7-10

1.2 Εξαγωγή DNA

Για το σκοπό της γενετικής ανάλυσης των πολυμορφισμών στην ομάδα των ασθενών αποκτήθηκε περιφερειακό αίμα από τους συμμετέχοντες και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 ° C μέχρι την εκχύλιση DNA. Το γονιδιωματικό DNA εκχυλίστηκε από τα δείγματα αίματος με τη χρήση ενός κιτ εκχύλισης γονιδίων από ολικό αίμα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -80 ° C αναμένοντας περαιτέρω χρήση.

1.3 Ανίχνευση πολυμορφισμών του γονιδίου του BAFFR

Η ανίχνευση του P21R (rs77874543) πολυμορφισμού και του H159Y πολυμορφισμού (rs61756766) του γονιδίου του BAFFR πραγματοποιήθηκε αρχικώς με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) όπου ενισχύθηκαν το εξόνιο 1 και το εξόνιο 3 αντίστοιχα. Στη συνέχεια μετά την ανίχνευση των περιοχών ενδιαφέροντος του γονιδίου του BAFFR πραγματοποιήθηκε ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραύσματος περιορισμού (restriction fragment length polymorphism-RLFP) όπου με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (ενδονουκλεασών) πραγματοποιήθηκε πέψη των ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου για ανίχνευση των πολυμορφισμών. Ο H159Y πολυμορφισμός αναφέρεται ότι βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον P21R πολυμορφισμό [54]. Αυτό σημαίνει ότι η H159Y μετάλλαξη εάν υπάρχει μεταβιβάζεται ταυτόχρονα με την P21R μετάλλαξη. Για το λόγο αυτό ο H159Y

πολυμορφισμός μελετήθηκε μόνο σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ή ομοζυγωτίας για την πρώτη μετάλλαξη (P21R).

1.3A Ενίσχυση των εξονίων 1 & 3/ Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για την ενίσχυση των αλληλουχιών του εξονίου 21 και εξονίου 3 οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από μία προηγούμενη μελέτη που εξέτασε την παρουσία των πολυμορφισμών αυτών και τη σχέση τους σε ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια [39].

Οι εκκινήτες για το εξόνιο 1 είναι:

- 5-AGC CTC AGT CCC CGC AGC T-3 (forward)
- 5-GTT CTC CCC GCA GCT GCC G-3 (reverse)

Οι εκκινήτες για το εξόνιο 3 είναι:

- 5-CCT CCA GAG GAG TCT TCT AG-3 (forward)
- 5-TCC AAG CCC CTG GCT GGG-3 (reverse)

Οι αντιδράσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση τόσο του εξονίου 1 όσο και του εξονίου 3 πραγματοποιήθηκαν σε ένα μείγμα αντίδρασης τελική ποσότητας 30ml που περιείχε 40-200ng DNA.

Το μείγμα της Πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε και για τις δύο αντιδράσεις ετοιμάστηκε με 2,2μl Taq Πολυμεράση και 50μl νερό (H₂O).

Οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των υπόλοιπων συστατικών για την αντίδραση πολυμεράσης για το εξόνιο 1 και 3 παρουσιάζονται αντίστοιχα στη συνέχεια.

A. PCR MasterMix για ενίσχυση του εξονίου 1

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μl)
H ₂ O	199,3
PCR buffer 10x	50
MgCl ₂ 100 mM	7,5
dNTPs 2,5 mM	40
BAFFR 1 S	10
BAFFR 1 AS	10
DMSO 12%	43,2

B. PCR MasterMix για ενίσχυση του εξονίου 2

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος Όγκος (μl)
H ₂ O	192,5
PCR buffer 10x	50
MgCl ₂ 100 mM	7,5
dNTPs 2,5 mM	40
BAFFR 3 S	10
BAFFR 3 AS	10
DMSO 12%	50

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 6μl του μείγματος της πολυμεράσης, 22μl από το αντίστοιχο MasterMix για το κάθε εξόνιο και 2μl γενετικού υλικού (DNA). Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 30μl. Σε πρώτο βήμα διανεμήθηκαν 22μl του MasterMix σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης PCR. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε κάθε σωληνάριο 6μl του μείγματος της πολυμεράσης. Η διαδικασία αυτή (διανομή MasterMix και πολυμεράσης) έγινε υπό προστατευμένες συνθήκες σε κρύο σταθμό εργασίας PCR. Στην συνέχεια τα γεμισμένα με MasterMix και πολυμεράση PCR σωληνάρια εξέρχονται από τον προστατευμένο σταθμό εργασίας με σκοπό να προστεθούν τα 2μl δείγματος DNA των ασθενών. Η κίνηση αυτή όπου η διανομή του γενετικού υλικού γίνεται έξω από τον προστατευμένο σταθμό εργασίας, γίνεται με σκοπό να αποφύγουμε την επιμόλυνση του σταθμού εργασίας και των εργαλείων που βρίσκονται σε αυτόν με γενετικό υλικό. Παράλληλα, για να εκτιμήσουμε την ύπαρξη επιμόλυνσης κατά την εργασία μας κάθε φορά χρησιμοποιούμε ένα αρνητικό κοντρόλ που δεν περιέχει DNA (σε αυτή τη περίπτωση το γενετικό υλικό αντικαθίσταται με 2μl H₂O και η όλη εργασία γίνεται μέσα στον προστατευμένο σταθμό εργασίας). Αφού τοποθετήσουμε και τα δείγματα DNA σε κάθε PCR σωληνάριο μεταφέρουμε τα δείγματα στον θερμικό κυκλοποιητή για έναρξη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης διακρίνεται στα εξής βήματα τα οποία επαναλαμβάνονται με αποτέλεσμα τη εκθετική αύξηση του γενετικού μας υλικού.

- 1^ο Αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA
- 2^ο Προσαρμογή των εκκινητών στο κάθε εκμαγείο του DNA
- 3^ο Επιμήκυνση των εκκινητών.

Η όλη διαδικασία συμπληρώνεται από ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης του DNA σε αρκετά υψηλή θερμοκρασία και μία τελική φάση επιμήκυνσης η οποία διαρκεί μερικά λεπτά. Αυτά τα δύο βήματα (αρχική αποδιάταξη και τελική φάση επιμήκυνσης) γίνονται μόνο μία φορά.

A. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή για το εξόνιο 1

Η χρονική διάρκεια της αντίδρασης πολυμεράσης με 30 κύκλους για την ενίσχυση του 1^{ου} εξονίου είναι 52 λεπτά.

Πρωταρχικό βήμα αποδιάταξης: 94°C για 2 λεπτά

Αποδιάταξη της διπλής έλικας: 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Ξεδίπλωμα & προσαρμογή των εκκινητών: 60 °C για 30 δευτερόλεπτα

Επιμήκυνση: 72 °C για 30 δευτερόλεπτα



Τελική φάση επιμήκυνσης: 72 °C για 5 λεπτά

B. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή για το εξόνιο 3

Η χρονική διάρκεια της αντίδρασης πολυμεράσης με 40 κύκλους για την ενίσχυση του 3^{ου} εξονίου είναι 1 ώρα και 10 λεπτά.

Πρωταρχικό βήμα αποδιάταξης: 94°C για 2 λεπτά

Αποδιάταξη της διπλής έλικας: 94°C για 15 δευτερόλεπτα

Ξεδίπλωμα & προσαρμογή των εκκινητών: 51 °C για 15 δευτερόλεπτα

Επιμήκυνση: 72 °C για 40 δευτερόλεπτα

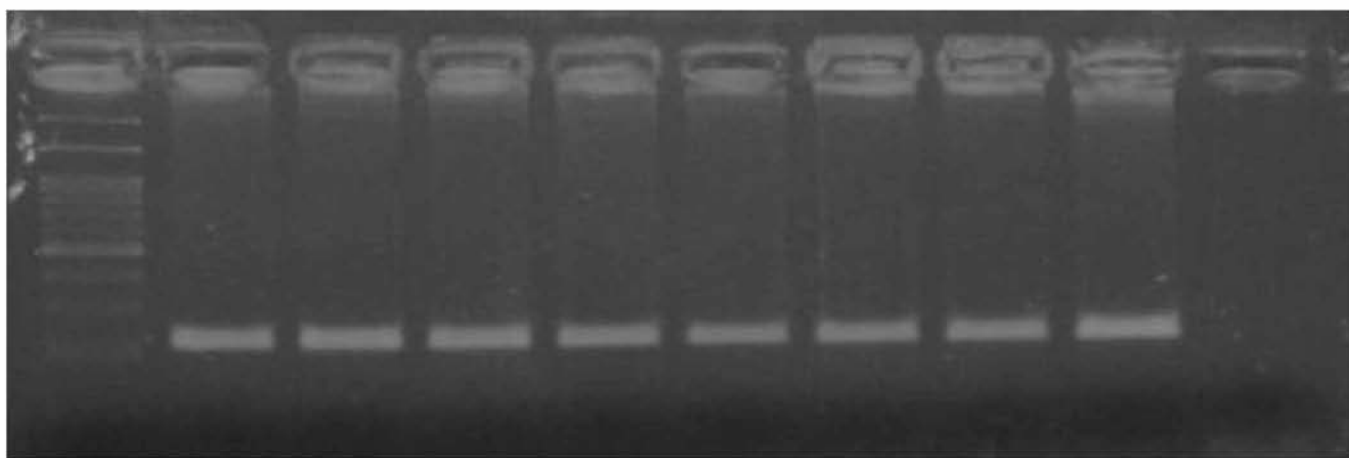


Τελική φάση επιμήκυνσης: 72 °C για 5 λεπτά

Αφού τοποθετήσουμε τα PCR σωληνάρια με τα δείγματα στην πλάκα του θερμοκυκλοφορητή, επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα το οποίο έχουμε υποδείξει προηγουμένως, ρυθμίζουμε τον όγκο αντίδρασης στα 30μl και πατάμε εκκίνηση.

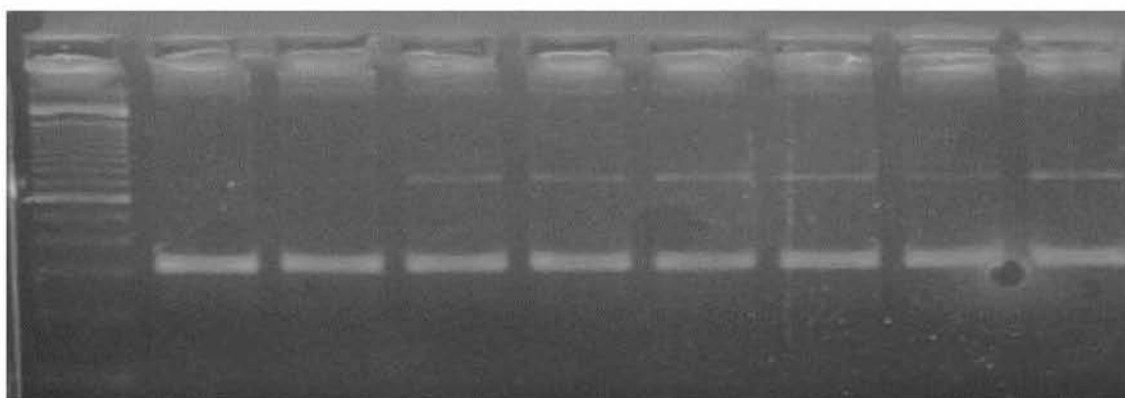
Αποθηκεύουμε τα δείγματά μας με τα ενισχυμένα προϊόντα στους 4 °C μέχρι τα επόμενα βήματα.

Στη συνέχεια, για να επιβεβαιώσουμε ότι λάβαμε το ενισχυμένο προϊόν χωρίς επιμόλυνση διεξήχθη ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 2%. Για το εξόνιο 1 ηλεκτροφορήσαμε τα δείγματά μας στα 120 Volts για 30 λεπτά και αναμέναμε ένα προϊόν 223 bp (εικόνα 1). Για το εξόνιο 3 τα δείγματα μετά την PCR ηλεκτροφορήθηκαν επίσης για 30 λεπτά στα 120 Volts. Το προϊόν που περιμένουμε έχει μέγεθος 323 bp (εικόνα 2).



Εικόνα 1.

Ενισχυμένο εξόνιο 1 του BAFFR γονιδίου μεγέθους 223 bp



Εικόνα 2.

Ενισχυμένο εξόνιο 3 του BAFFR γονιδίου μεγέθους 323 bp

1.3B Ανίχνευση πολυμορφισμών με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων.

A. Ανίχνευση του P21R πολυμορφισμού στο εξόνιο 1

Μετά τη διαδικασία PCR του 1^{ου} εξονίου, το ενισχυμένο προϊόν μεγέθους 223bp υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού EagI (New England Biolabs, UK). Το μείγμα του ενζύμου για τη διαδικασία πέψης είχε αρχικώς τις εξής αναλογίες.

- **H₂O:** 150μl
- **10x NEBuffer 3:** 30μl
- **EagI ένζυμο:** 5μL

Για τη διαδικασία της πέψης χρησιμοποιήθηκαν 6μl από το προϊόν PCR και 9μl από το μείγμα του ενζύμου που προετοιμάσαμε με τις αναλογίες που περιγράψαμε προηγουμένως. Εξαιτίας όμως προβλημάτων που συναντήσαμε με ατελή πέψη η ποσότητα του ενζύμου στο αρχικό mix αναθεωρήθηκε και αποφασίσαμε να τριπλασιάσουμε την συγκέντρωση. Επομένως οι νέες αναλογίες του μείγματος του ενζύμου είναι:

- **H₂O:** 135μl
- **10x NEBuffer 3:** 30μl
- **EagI ένζυμο:** 15 μL

Παρά τον τριπλασιασμό της ποσότητας του ενζύμου, τα φαινόμενα ατελούς πέψης συνεχίστηκαν. Επόμενη κίνηση μας ήταν να αραιώσουμε την ποσότητα του δείγματος PCR που θα προσθέταμε στην αντίδραση πέψης, αντικαθιστώντας κάποια ποσότητα του ενισχυμένου DNA προϊόντος με H₂O. Η αρχική ποσότητα DNA προς πέψη ήταν 6μl. Για να έχουμε όμως μία πλήρη αντίδραση πέψης που θα περιέχει και αρκετή ποσότητα DNA ώστε να έχουμε καλή εικόνα, έπρεπε να εξακριβώσουμε ποια θα είναι η βέλτιστη ποσότητα PCR προϊόντος από τα αρχικά 6μl που θα χρησιμοποιήσουμε στην αντίδραση.

Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε σε διαδοχικές αραιώσεις ενός σχετικά πυκνού PCR προϊόντος, αντικαθιστώντας σταδιακά 1μl DNA προϊόντος με 1μl H₂O. Στη συνέχεια θέσαμε σε διαδικασία πέψης τα αραιωμένα δείγματα με ποσότητες 6, 5, 4, 3 και 2 μl DNA αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα ανάλυσης εικόνων από ηλεκτροφόρηση DNA (gel analyzer) καθορίσαμε τα pixels των αραιωμένων δειγμάτων τα οποία είχαμε ηλεκτροφορήσει και στη συνέχεια παρατηρώντας τις εικόνες πέψης εντοπίσαμε ότι η

βέλτιστη συγκέντρωση PCR δείγματος ήταν τα 300 pixels. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στην αντίδραση πέψης χρησιμοποιούνται 6μl από το PCR προϊόν, την τελική ποσότητα ώστε να βελτιστοποιηθεί η αντίδραση μας την δίνει η σχέση:

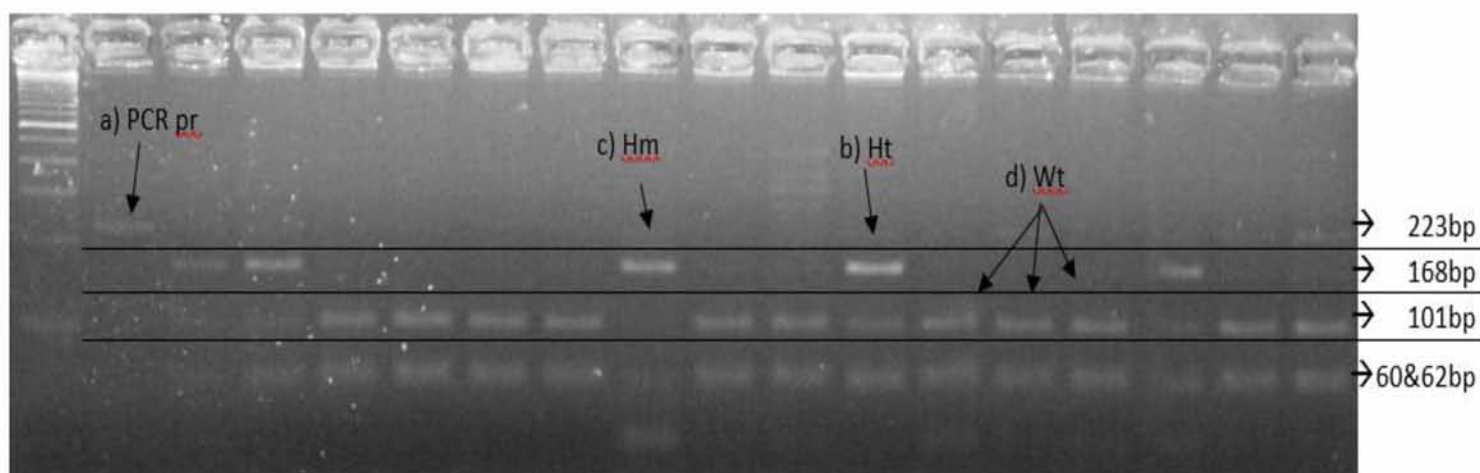
$$x (\mu\text{l}) = 6(\mu\text{l}) * \frac{\text{Βέλτιστη Συγκέντρωση}}{\text{Αρχική Συγκέντρωση}}$$

Για παράδειγμα εάν θεωρήσουμε ότι αρχικά έχουμε ένα προϊόν με συγκέντρωση 600 pixels, στην αντίδραση πέψης θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε $x = 6(\mu\text{l}) * \frac{300 \text{ pixels}}{600 \text{ pixels}} = 6(\mu\text{l}) * \frac{1}{2} = 3\mu\text{l}$ DNA προϊόντος, όπως είναι αναμενόμενο τα υπόλοιπα 3μl τα αντικαθιστούμε με H₂O ώστε να φτάσουμε στην τελική ποσότητα των 6μl

Ακολουθήσαμε την διαδικασία πέψης όπως περιεγράφηκε για όλα τα δείγματα, όπου 9μl από το νέο μείγμα του ενζύμου αναμείχθηκαν με 6μl του κατάλληλα αραιωμένου PCR προϊόντος, σε καθαρά σωληνάρια με τελικό όγκο αντίδρασης 15μl. Η αντίδραση πέψης έλαβε χώρα σε υδατόλουτρο στους 37,5 °C για τουλάχιστον 8 ώρες ή κατά την διάρκεια της νύχτας.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της πέψης έγινε σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης 3% η οποία πραγματοποιήθηκε για 45 λεπτά στα 120 Volt. Οι ασθενείς που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό (wt-wild type) παρουσιάζουν 2 θέσεις περιορισμού στο εξόνιο 1 για το ένζυμο, ενώ η παρουσία του πολυμορφισμού καταργεί μία από τις θέσεις πέψης. Επομένως πέψη των wt αλληλίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία 3 διαφορετικών θραυσμάτων μεγέθους 101, 62 και 60 bp. Από την πέψη αλληλόμορφων με τη παρουσία του P21R πολυμορφισμού προκύπτουν 2 θραύσματα μεγέθους: 168 και 60 bp. Καθώς τα ετερόζυγα άτομα φέρουν ένα αλληλόμορφο με τον πολυμορφισμό και ένα χωρίς προκύπτουν 4 θραύσματα μεγέθους: 168 + 101 + 62 + 60 bp. (Εικόνα 3)

- Wild Type: 101bp + 62bp + 60bp
- P21R-Ομοζυγώτες: 168bp + 60bp
- P21R-Ετεροζυγώτες: 168 + 101 + 62 + 60 bp



Εικόνα 3.

a) BAFFR Εξόνιο 1 PCR προϊόν, 223bp, b) P21R Ετεροζυγώτες (Ht), 168bp, 101bp, 60 & 62bp, c) P21R Ομοζυγώτες (Hm), 168bp, 60 & 62bp, d) P21R wild type (Wt), 101bp, 60&62bp.

B. Ανίχνευση του H159Y πολυμορφισμού στο εξόνιο 3

Μετά τη διαδικασία PCR του 3^{ου} εξονίου, το ενισχυμένο προϊόν μεγέθους 323bp υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού MscI (New England Biolabs, UK). Το μείγμα του ενζύμου για τη διαδικασία πέψης ετοιμάστηκε με τις εξής αναλογίες.

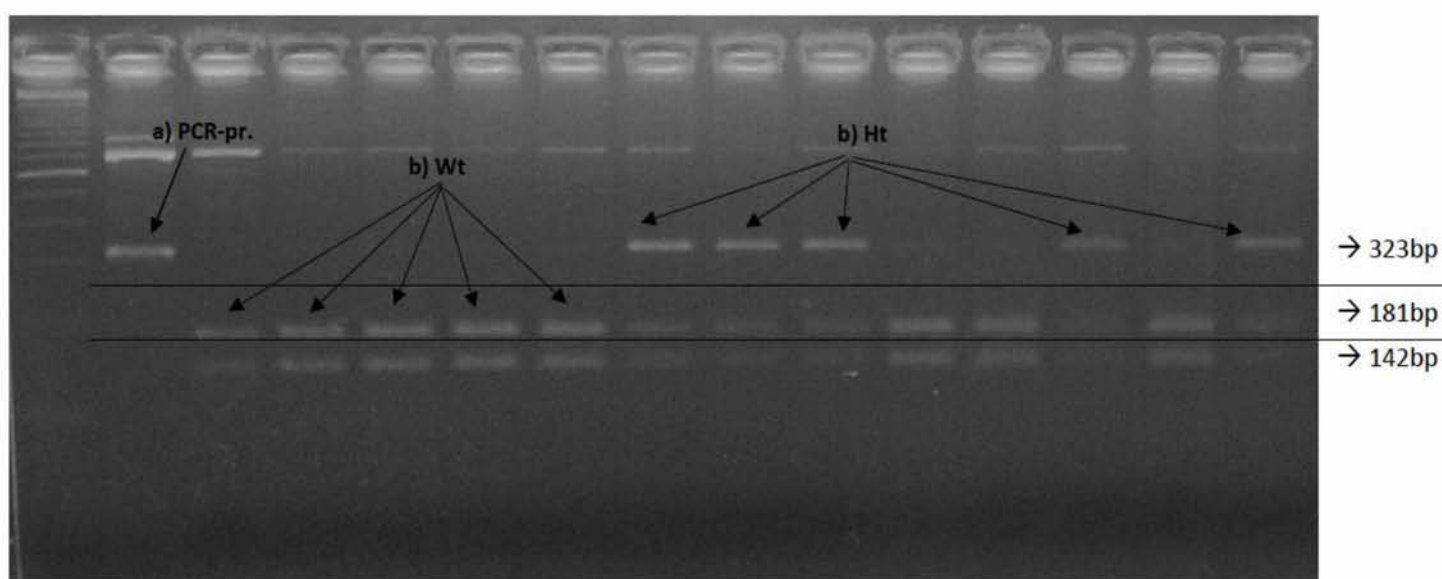
- **H₂O**: 135μl
- **10x NEBuffer 4**: 30μl
- **MscI ένζυμο**: 20μL

Για τη διαδικασία της πέψης του 3ου εξονίου μεγέθους 323 bp αναμίχθηκαν 6μl από το προϊόν PCR με 9μl από το μείγμα του MscI ενζύμου που προετοιμάσαμε με τις αναλογίες που περιγράψαμε προηγουμένως. Ο τελικός όγκος του προϊόντος ήταν 15μl. Η αντίδραση πέψης έλαβε χώρα σε υδατόλουτρο στους 37 °C για τουλάχιστον 8 ώρες ή κατά την διάρκεια της νύχτας.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της πέψης του 3^{ου} έγινε σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης 3% η οποία πραγματοποιήθηκε για 45 λεπτά στα 120 Volt. Οι ασθενείς που δεν φέρουν τον πολυμορφισμό (wt-wild type) παρουσιάζουν 1 θέση περιορισμού στο εξόνιο 3 για το MscI, ενώ η παρουσία του πολυμορφισμού καταργεί αυτή τη θέση πέψης. Επομένως πέψη των wt αλληλίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία 2 διαφορετικών θραυσμάτων μεγέθους 181 + 142 bp. Από την πέψη

αλληλόμορφων με τη παρουσία του H159Y πολυμορφισμού προκύπτει ολόκληρο το αρχικό προϊόν μεγέθους 323bp. Καθώς τα ετερόζυγα άτομα φέρουν ένα αλληλόμορφο με τον πολυμορφισμό και ένα χωρίς προκύπτουν 3 θραύσματα μεγέθους: 323 + 181 + 142 bp. (Εικόνα 4)

- Wild Type: 181 + 142 bp
- H159Y -Ομοζυγώτες: 323 bp
- H159Y -Ετεροζυγώτες: 323 + 181 + 142 bp



Εικόνα 4.

a) BAFFR Εξόνιο 3 PCR pr, 323bp, b) H159Y wild type (Wt) 181bp, 142bp, c) P21R Heterozygotes (Ht), 323bp, 181bp, 142bp,

1.4 Καταληκτικά Σημεία

Βασικός σκοπός της μελέτης ήταν να εξετάσουμε εάν η παρουσία των P21R και H159Y πολυμορφισμών σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας επηρεάζει το φαινότυπο της νόσου και συγκεκριμένα αν σχετίζεται με την σοβαρότητα της νόσου. Επομένως, ως πρωταρχικό καταληκτικό ορίσαμε τη σχέση των πολυμορφισμών με το δείκτη βαρύτητάς της νόσου που εκφράζεται από το MSSS.

Ως δευτερεύοντα καταληκτικά σημεία εξετάσαμε την επίδραση των πολυμορφισμών στην ηλικία εκδήλωσης της πολλαπλής σκλήρυνσης, στη διάρκεια της νόσου και στο βαθμό αναπηρίας. Εξετάσαμε δηλαδή εάν άτομα που φέρουν τα P21R ή H159Y αλληλόμορφα εμφανίζουν τη νόσο νωρίτερα, εάν οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν τη διάρκεια της νόσου και αν σχετίζονται με το βαθμό αναπηρίας που περιγράφεται από το μέτρο EDSS. Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε ανάλυση υποομάδων ώστε εξετάσουμε τυχόν διαφορές των παραπάνω κλινικών χαρακτηριστικών, όσων αφορά την H159Y μετάλλαξη, στον πληθυσμό των ασθενών που φέρουν το P21R αλληλόμορφο (δηλαδή την ομάδα των ασθενών που είναι ετερόζυγοι ή ομόζυγοι για το P21R).

Τέλος, εκτιμήσαμε τη συχνότητα εμφάνισης των προαναφερθέντων πολυμορφισμών σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας και σε υγιείς ανθρώπους. Επιλέξαμε να μελετήσουμε τον κυρίαρχο τρόπο κληρονομικότητας λόγω της κυρίαρχης επίδρασης της P21R μετάλλαξης στην λειτουργία του υποδοχέα [52].

1.5 Στατιστική Ανάλυση

Συγκρίσεις μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών έγιναν με τη βοήθεια του χ-τετράγωνο τεστ του Pearson's (Pearson's chi-square test). Για να επιλεγεί το κατάλληλο τεστ οι συνεχείς μεταβλητές αρχικώς εξετάστηκαν για την παρουσία της κανονικότητας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα τεστ κανονικότητας του Shapiro-Wilk και του Kolmogorov-Smirnov, ενώ επίσης αξιολογήθηκαν γραφικές μέθοδοι ελέγχου την κανονικότητας όπως το ιστόγραμμα συχνοτήτων και το QQ-plot (quantile-quantile plot). Για συνεχείς μεταβλητές που δεν πληρούν την κανονικότητα χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney U, test που αποτελεί μη-παραμετρική μέθοδος εκτίμησης. Οι μεταβλητές "ηλικία έναρξης της νόσου", "διάρκεια της νόσου" και "βαρύτητα της νόσου (MSSS)" δεν πληρούσαν την κανονικότητα οπότε χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι εκτίμησης (δηλαδή το Mann-Whitney U). Το Mann-Whitney U τεστ χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη σύγκριση του βαθμού αναπηρίας (EDSS) των ασθενών, καθώς το μέτρο EDSS δεν είναι συνεχείς μεταβλητή αλλά "ordinal". Καθώς η βαρύτητα της νόσου (MSSS) εξετάστηκε μεταξύ των 3 ομάδων με ήπια, μέτρια και σοβαρή ενεργότητα νόσου, το Pearson's chi-square test χρησιμοποιήθηκε αρχικώς για να εντοπίσουμε εάν υπάρχει διαφορά στις συχνότητες των πολυμορφισμών μεταξύ των

τριών ομάδων συνολικά. Στη συνέχεια για να συγκρίνουμε ξεχωριστά την κάθε ομάδα ασθενών με την άλλη χρησιμοποιήσαμε “multinomial logistic regression” και πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική αλλά και πολυπαραγοντική ανάλυση όπου προσαρμόσαμε για το φύλο. Το επίπεδο σημαντικότητας για τις συγκρίσεις ορίστηκε στο two-sided $p < 0.05$. Το στατιστικό πακέτο SPSS V22 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση.

2. Αποτελέσματα

2.1 Χαρακτηριστικά ασθενών

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 517 ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας. Από το σύνολο όμως των ασθενών υπήρχαν ελλιπή στοιχεία για “την ηλικία έναρξης” της νόσου σε 8 ασθενείς, για τη “χρονική διάρκεια της νόσου” σε 27 ασθενείς, για το “βαθμό αναπηρίας-EDSS” σε 17 ασθενείς και σε 27 ασθενείς για τη “βαρύτητα της νόσου-MSSS”. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα μόνο 490 ασθενείς να αναλυθούν για το πρωτεύον καταληκτικό σημείο που είναι η βαρύτητα της νόσου, ενώ για τα δευτερεύοντα καταληκτικά σημεία: “ηλικία έναρξης”, “χρονική διάρκεια” και “βαθμός αναπηρίας” της νόσου μελετήθηκαν 509, 490 και 500 ασθενείς αντίστοιχα.

Οι συχνότητες των διάφορων χαρακτηριστικών των ασθενών παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Από τους 517 ασθενείς που

SEX	<i>n</i> =517
Male <i>n</i> (%)	163 (31.5%)
Female <i>n</i> (%)	354 (68.5%)
Age of Onset (years)	<i>n</i> =509
Mean ± SD	32.21 ± 10.19
Median	31
Min/Max	13/69
Disease Duration	<i>n</i> =490
Mean ± SD	11.65 ± 8.16
Median	10
Min/Max	1/57
MSSS	<i>n</i> =490
Mean ± SD	4.52 ± 2.5
Median	3.89
Min/Max	0.26/9.99
Benign MS <i>n</i> (%)	81 (16.5%)
Moderate MS <i>n</i> (%)	318 (64.9%)
Severe MS <i>n</i> (%)	91 (18.6%)
EDSS	<i>n</i> =500
0-2.5	216 (43.2%)
3-5.5	164 (32.8%)
6-6.5	73 (14.6%)
7-10	47 (9.4%)
P21R	<i>n</i> =517
wt/wt <i>n</i> (%)	453 (87.6%)
wt/P21R <i>n</i> (%)	62 (11.9%)
P21R/P21R <i>n</i> (%)	2 (0.38%)
H159Y (P21R+)	<i>n</i> =64
wt/wt <i>n</i> (%)	41 (64%)
wt/H159Y <i>n</i> (%)	23 (35.9%)
H159Y/H159Y <i>n</i> (%)	0 (0%)

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ασθενών

αντιμετωπίστηκαν στην Νευρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας οι 136 ήταν άνδρες και 354 γυναίκες. Η αναλογία ανδρών γυναικών ήταν 1 προς 2,6.

Η μέση ηλικία έναρξης της νόσου ήταν τα 32 χρόνια, ενώ η μικρότερη ηλικία εμφάνισης της νόσου που αναφέρθηκε ήταν τα 13 χρόνια και η μεγαλύτερη τα 69 χρόνια.

Η μέση διάρκεια της νόσου των ασθενών είναι τα 11,6 χρόνια με αρκετά όμως μεγάλο εύρος, καθώς υπάρχουν ασθενείς με μόλις ένα έτος παρακολούθησης και ασθενείς που έχουν την νόσο για 57 χρόνια.

Η μέση βαρύτητα της νόσου σύμφωνα με το δείκτη βαρύτητας -MSSS βρέθηκε να είναι 4,5, ενώ σύμφωνα με το δείκτη αναπηρίας ο διάμεσος βαθμός EDSS των ασθενών βρέθηκε να είναι 3.

Δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές διαφορές στα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου μεταξύ ανδρών και γυναικών. Οι συχνότητες των κλινικών χαρακτηριστικών ανάλογα με το φύλο αναφέρονται στον πίνακα 2.

		Age of Onset	EDSS	Disease Duration	MSSS
Male	Mean \pm SD	32.4 \pm 10.9	3.7 \pm 2.3	10.6 \pm 7.8	4.8 \pm 2.5
	Median	31	3	10	4
	Range	13-69	0-9.5	1-57	0.64-9.9
Female	Mean \pm SD	32 \pm 9.8	3.6 \pm 2,2	12 \pm 8	4.4 \pm 2.5
	Median	31.5	3	10	3.9
	Range	14-69	0-10	1-56	0.26-9.9
Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά βάση φύλου					

2.2 Συχνότητες αλληλόμορφων.

Από τους 517 ασθενείς μόνο οι 64 (12,4%) έφεραν τον P21R πολυμορφισμό, με μόνο 2 εξ' αυτών να είναι ομοζυγώτες. Για H159Y πολυμορφισμό βρέθηκαν 23 ασθενείς θετικοί, δηλαδή το 4,4% του συνολικού δείγματος των 517 ασθενών ή το 35,9% του δείγματος των ασθενών που ήταν θετικοί για τον P21R πολυμορφισμό. Από του H159Y θετικούς ασθενείς όλοι ήταν ετεροζυγώτες. Η συχνότητα των πολυμορφισμών στο γκρουπ των υγιών ατόμων (control group) ακολουθούσε την ισορροπία του Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). Οι συχνότητες εμφάνισης κανενός από τους δύο πολυμορφισμούς δεν διέφερε μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Οι κατανομές συχνοτήτων των αλληλόμορφων των ασθενών και των μαρτύρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

SNP	Allele frequencies	MS patients n=517 n(%)	Controls n=316 n(%)	p	OR 95%CI
P21R	wt/wt	453 (87.6%)	280 (88.6%)	0.91	-
	wt/P21R	62 (11.9%)	35 (11.1%)		
	P21R/P21R	2 (0.38%)	1 (0.31%)		
	<i>Dominant Model</i>			0.67	0.91 (0.59-1.4)
H159Y	wt/wt	453 (87.6%)	280 (88.6%)	0.16	-
	wt/H159Y	23 (4.4%)	8 (2.5%)		
	H159Y/H159Y	0 (0%)	0 (0%)		
	<i>Dominant Model</i>			0.16	0.56 (0.25-1.26)
Πίνακας 3. Συχνότητες αλληλόμορφων σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες					

2.3 Βαρύτητα της νόσου (MSSS).

2.3A P21R.

Από τους ασθενείς που ήταν θετικοί για τον P21R πολυμορφισμό 8 (13.6%) ασθενείς παρουσιάζουν ήπιας βαρύτητας σκλήρυνση κατά πλάκας, 44 (74.6%) ασθενείς παρουσιάζουν μέτριας βαρύτητας σκλήρυνση κατά πλάκας και 7 (11.9%) ασθενείς παρουσιάζουν σοβαρή νόσο. Οι αντίστοιχες συχνότητες για του ασθενείς που ήταν αρνητικοί για τον P21R πολυμορφισμό είναι 74 (17.2%), 274 (63.6%) and 83 (19.3%) αντίστοιχα. Η μέση βαρύτητα της νόσου βρέθηκε να είναι 4,43 για τους P21R θετικούς ασθενείς και 4,54 για τους wild-type ασθενείς. Η βαρύτητα της νόσου στις 3 αυτές κατηγορίες δεν φάνηκε να διαφέρει μεταξύ των ασθενών που φέρουν τη μετάλλαξη και αυτών που είναι αρνητικοί (Pearson's chisquare test $p=0.252$) (Πίνακας 4).

	P21R(+)	P21R(-)	p	H159Y(+)	H159Y(-)	p
SEX	n=64	n=453		n=23	n=494	
Male n(%)	18 (28.1%)	145 (32%)	0.531*	6 (26.1%)	157 (31.8%)	0.566*
Female n(%)	46 (71.9%)	308 (68%)		17 (73.9%)	337 (68.2%)	
Age of Onset	n=62	n=447		n=22	n=487	
Mean ± SD	32.64 ± 9.85	32.15 ± 10.24	0.739**	29.77 ± 8.74	32.32 ± 10.24	0.271**
Median	31.5	31		28	31	
Min/Max	15/60	13/69		15/49	13/69	
Disease Duration	n=59	n=431		n=22	n=468	
Mean ± SD	10.61 ± 7.23	11.8 ± 8.28	0.336**	10.68 ± 8.43	11.7 ± 8.1	0.460**
Median	9	10		9	10	
Min/Max	1/43	1/57		1/43	1/57	
MSSS	n=59	n=431		n=22	n=468	
Mean ± SD	4.43 ± 2.34	4.54 ± 2.52	0.929**	3.99 ± 2.25	4.55 ± 2.51	0.337**
Median	3.89	3.93		3.89	3.94	
Min/Max	0.28/9.75	0.26/9.99		0.78/8.34	0.26/9.99	
Benign MS n(%)	7 (11.9%)	74 (17.2%)		3 (13.6%)	78 (16.7%)	
Moderate MS n(%)	44 (74.6%)	274 (63.6%)	0.252*	17 (77.3%)	301 (64.3%)	0.412*
Severe MS n(%)	8 (13.6%)	83 (19.3%)		2 (9.1%)	89 (19%)	
EDSS	n=61	n=439		n=22	n=478	
Median	2	3	0.26**	0	3	0.26**
Min/Max	0/9	0/10		1/7	0/10	
0-2.5	31 (50.8%)	185 (42.1%)		13 (59.1%)	203 (42.5%)	
3-5.5	18 (29.5%)	146 (33.3%)	0.45*	4 (18.2%)	160 (33.5%)	0.3*
6-6.5	9 (14.8%)	64 (14.6%)		4 (18.2%)	69 (14.4%)	
7-10	3 (4.7%)	44 (9.7%)		1 (4.5%)	46 (9.6%)	
*Pearsons chi-square						
**Mann-Whitney-U test						

Πίνακας 4. Σχέση P21R & H159Y πολυμορφισμών με κλινικά χαρακτηριστικά

Η ύπαρξη διαφοράς μεταξύ σοβαρούς και καλοήθους νόσου εξετάστηκε περαιτέρω ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην πιθανότητα εμφάνισης σοβαρής έναντι καλοήθους νόσου σε σχέση με την ύπαρξη του P21R πολυμορφισμού ($p = 0.972$). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όταν στο πολύπαραγοντικό μοντέλο προσαρμόσαμε τα αποτελέσματα ανάλογα της ηλικίας ($p = 0.946$). Δεδομένου ότι οι P21R και H159Y πολυμορφισμοί βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης δεν τοποθετήθηκαν μαζί στο πολύπαραγοντικό μοντέλο για να μην συναντήσουμε προβλήματα με συγγραμμικότητα. Στον πίνακα 5 παρουσιάζεται η μονοπαραγοντική και πολύπαραγοντική ανάλυση των ομάδων των ασθενών για τον P21R πολυμορφισμό για σοβαρή έναντι καλοήθους νόσου.

		OR 95%CI	p
Univariate	P21R	1.019 (0.352-2.946)	0.972
	H159Y	0.584 (0.095-3.587)	0.562
	SEX	1.991 (1.013-3.915)	0.046
Multivariate	<i>Adjusted for SEX</i>		
	P21R	1.035 (0.357-3.002)	0.946
	H159Y	0.604 (0.098-3.727)	0.587

Πίνακας 5. Σύγκριση ήπιας με σοβαρής βαρύτητας νόσου

2.3B H159Y.

Από τους ασθενείς που ήταν θετικοί για τον H159Y πολυμορφισμό 3 (13.6%) ασθενείς παρουσιάζουν ήπιας βαρύτητας σκλήρυνση κατά πλάκας, 17 (77.3%) ασθενείς παρουσιάζουν μέτριας βαρύτητας σκλήρυνση κατά πλάκας και 2 (2.9%) ασθενείς παρουσιάζουν σοβαρή νόσο. Οι αντίστοιχες συχνότητες για του ασθενείς που ήταν αρνητικοί για τον H159Y πολυμορφισμό είναι 78 (16.7%), 301 (64.3%) and 89 (19%) αντίστοιχα. Η μέση βαρύτητα της νόσου βρέθηκε να είναι 3,99 για τους H159Y θετικούς ασθενείς και 4,55 για τους wild-type ασθενείς. Η βαρύτητα της νόσου στις 3 αυτές κατηγορίες δεν φάνηκε να διαφέρει μεταξύ των ασθενών που φέρουν τη μετάλλαξη και αυτών που είναι αρνητικοί (Pearson's chisquare test $p=0.412$) (Πίνακας 4).

Η ύπαρξη διαφοράς μεταξύ σοβαρούς και καλοήθους νόσου εξετάστηκε περεταίρω ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην πιθανότητα εμφάνισης σοβαρής έναντι καλοήθους νόσου σε σχέση με την ύπαρξη του H159Y πολυμορφισμού ($p = 0.562$). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όταν στο πολύπαραγοντικό μοντέλο προσαρμόσαμε τα αποτελέσματα ανάλογα της ηλικίας ($p = 0.587$). Στον πίνακα 5 παρουσιάζεται η

μονοπαραγοντική και πολύπαραγοντική ανάλυση των ομάδων των ασθενών για τον H159Y πολυμορφισμό για σοβαρή έναντι καλοήθους νόσου.

2.4 Βαθμός Αναπηρίας (EDSS).

2.4A P21R.

Ελαφριά, μέτρια και σοβαρού βαθμού αναπηρία παρατηρήθηκε για 31 (50.8%), 27 (44.3%) και 3 (4.7%) ασθενείς αντίστοιχα που έφεραν τον πολυμορφισμό P21R. Για τους wild type ασθενείς οι αντίστοιχες συχνότητες ήταν 58 (42.1%), 210 (47.8%) και 44 (9.7%). Επειδή η αξιολόγηση του βαθμού αναπηρίας δεν γίνεται σε συνεχή κλίμακα, οι EDSS τιμές των ασθενών αναλύθηκαν με το Mann-Whitney-U test, το οποίο δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,26$) στο βαθμό αναπηρίας μεταξύ των ασθενών με ή χωρίς τον P21R πολυμορφισμό (πίνακας 4).

2.4B H159Y.

Για τους ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για τον H159Y πολυμορφισμό, μόνο ένας (4,5%) υπέφερε από σοβαρή αναπηρία. Από του υπόλοιπους 22, οι 8 (36,4%) ανέφεραν μέτρια και 13 (59,1%) ελαφριά αναπηρία. Οι αντίστοιχες συχνότητες για τους ασθενείς που βρέθηκαν αρνητικοί για τον H159Y πολυμορφισμό ήταν 46 (9,6%), 229 (47,9%) και 203 (42,5%) για σοβαρού, μέτριου και ελαφρού βαθμού αναπηρία αντίστοιχα. Ούτε για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό δεν κατορθώσαμε να διαπιστώσουμε στατιστικά σημαντική επιρροή του βαθμού αναπηρίας από την επικράτηση του πολυμορφισμού ($p = 0,26$). (πίνακας 4)

2.5 Ηλικία Έναρξης Νόσου

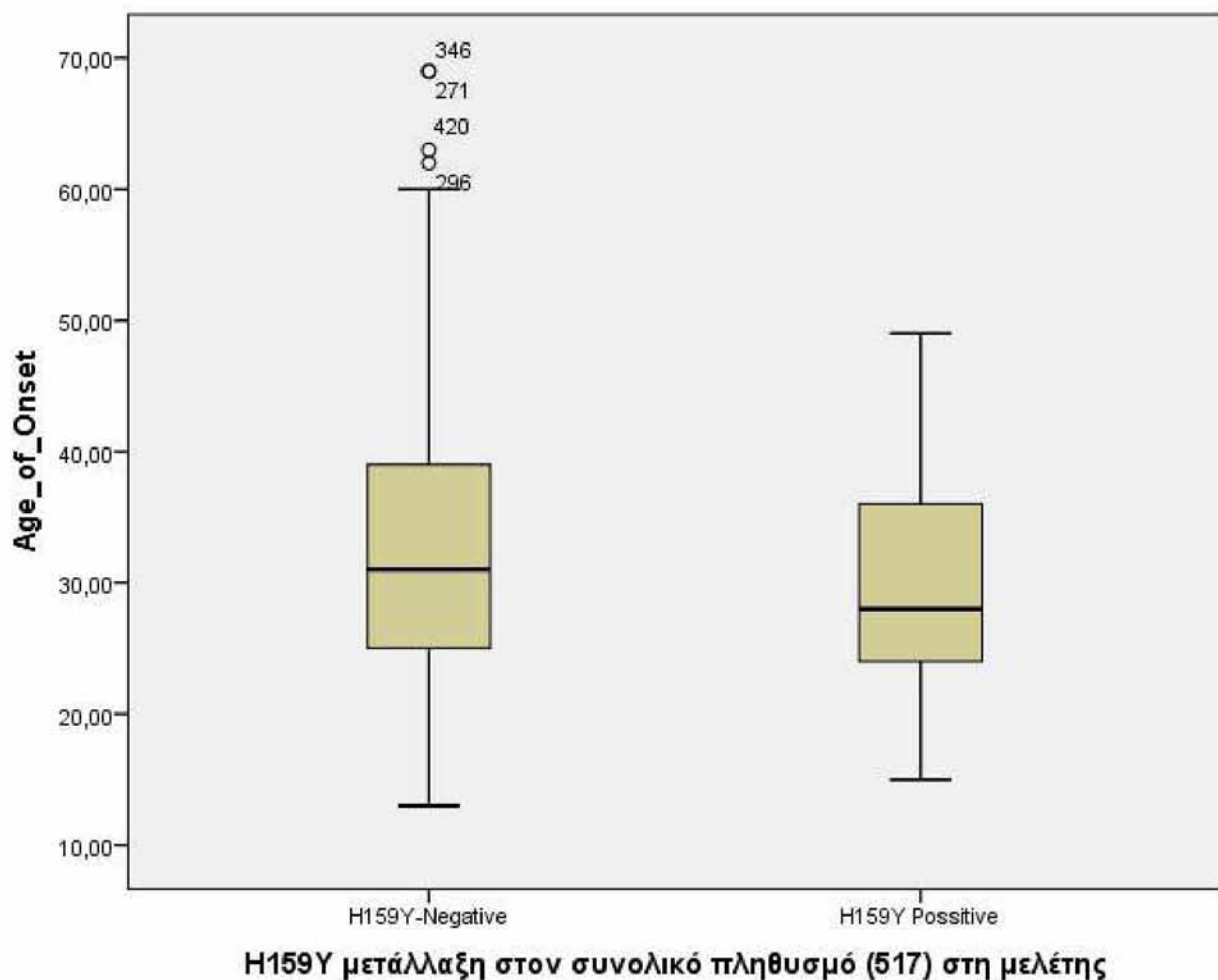
2.5A P21R.

Η διάμεση ηλικία των ασθενών κατά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων ήταν 31,5 για τους ασθενείς που ήταν θετικοί για το P21R πολυμορφισμό και 31 για όσους βρέθηκαν αρνητικοί. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ηλικία

έναρξης της νόσου για τις ομάδες των ασθενών ανάλογα της παρουσίας του P21R πολυμορφισμού.

2.5B H159Y.

Η διάμεση ηλικία των ασθενών κατά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων ήταν 28 χρόνια για τους ασθενείς που ήταν θετικοί για το H159Y πολυμορφισμό και 31 χρόνια για όσους βρέθηκαν αρνητικοί. Παρά το γεγονός ότι ασθενείς που ήταν θετικοί για τον H159Y πολυμορφισμό φάνηκε να εμφανίζουν τη νόσο 3 χρόνια νωρίτερα από τους ασθενείς που βρέθηκαν αρνητικοί (εικόνα 5), η διαφορά αυτή δεν βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική (Mann-Whitney-U test $p=0.27$)



Εικόνα 5.

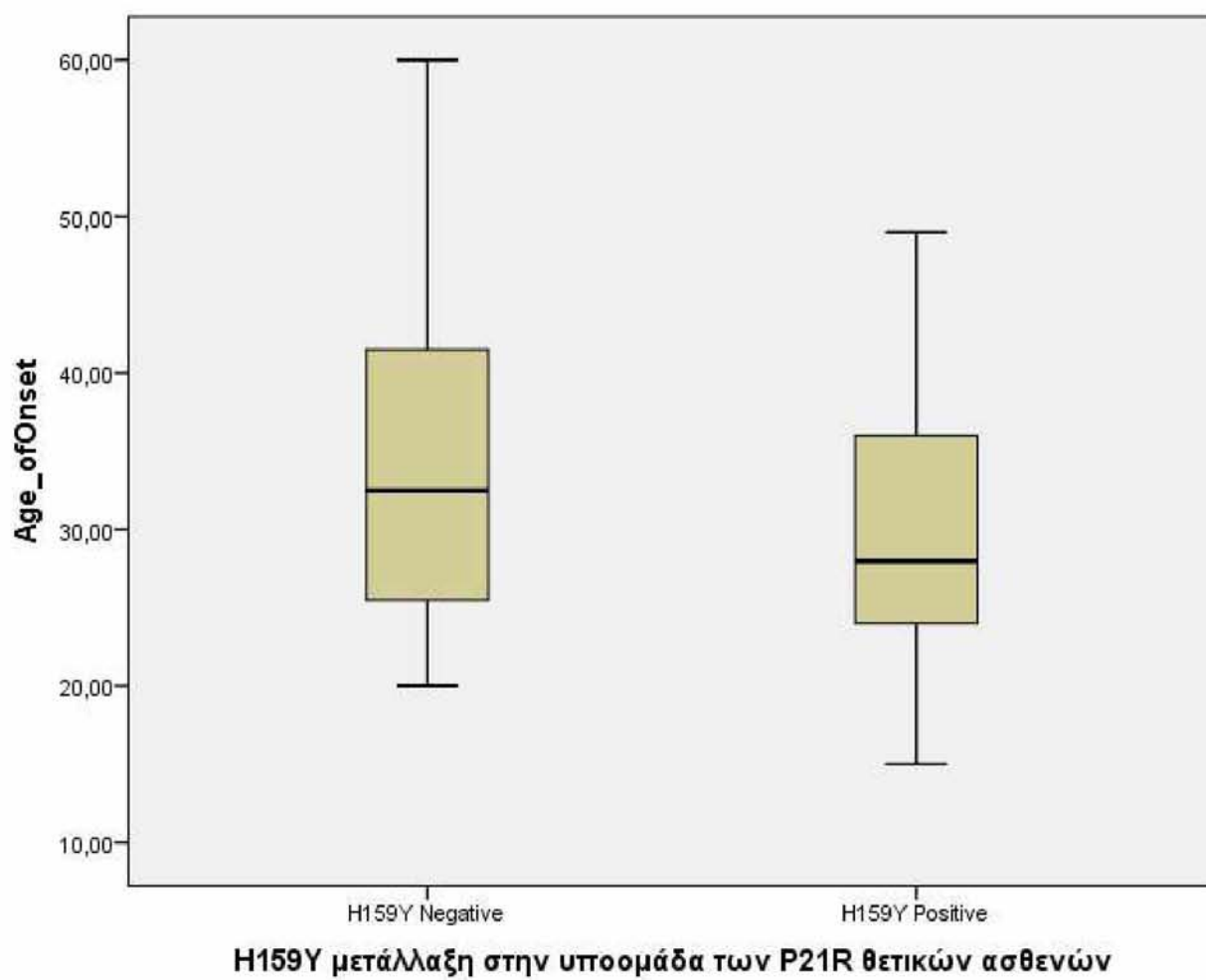
2.6 Διάρκεια της νόσου.

Η διάμεση διάρκεια νόσου για του P21R θετικούς ασθενείς ήταν 9 χρόνια, ενώ διάμεση διάρκεια νόσου για του P21R αρνητικούς ασθενείς ήταν 10 χρόνια. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για τη διάρκεια της νόσου σε σχέση με τον P21R πολυμορφισμό (Mann-Whitney-U test $p=0.33$). (Πίνακας 4)

Η διάμεση διάρκεια νόσου για του H159Y θετικούς ασθενείς ήταν 9 χρόνια, ενώ διάμεση διάρκεια νόσου για του H159Y αρνητικούς ασθενείς ήταν 10 χρόνια. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για τη διάρκεια της νόσου σε σχέση με τον H159Y πολυμορφισμό (Mann-Whitney-U test $p=0.46$). (Πίνακας 4)

2.7 Ανάλυση της υποομάδας των ασθενών με παρουσία του P21R.

Πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή ανάλυση του συνόλου των κλινικών χαρακτηριστικών (βαρύτητα της νόσου, βαθμός αναπηρίας, ηλικία έναρξης της νόσου, διάρκεια της νόσου) για την υποομάδα των ασθενών που βρέθηκαν θετικοί για το P21R πολυμορφισμό ώστε να συγκρίνουμε τυχόν διαφορές μεταξύ των ασθενών αυτών σε σχέση με την ύπαρξη και του δεύτερου πολυμορφισμού, του H159Y. Διαπιστώσαμε ότι μεταξύ των P21R θετικών ασθενών, αυτοί που έφεραν και τον H159Y πολυμορφισμό εμφάνιζαν την νόσο σε σχετικά μικρότερη ηλικία, καθώς η μέση ηλικία για τους P21R(+)/H159Y(+) ασθενείς ήταν 29,7 χρόνια έναντι 34,2 έτη για τους P21R(+)/H159Y(-) ασθενείς, ενώ η διάμεσος ηλικία έναρξης της νόσου ήταν 28 έναντι 32,5 χρόνια αντιστοιχα (Εικόνα 6). Παρόλα αυτά η διαφορά αυτή βρέθηκε, οριακά, μη στατιστικά σημαντική (Mann-Whitney-U test $p=0,096$). Σχετικά με τα υπόλοιπα κλινικά χαρακτηριστικά, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για την υποομάδα των P21R θετικών ασθενών σχετικά με την ύπαρξη του H159Y πολυμορφισμού. Το σύνολο της παρούσας ανάλυσης μπορεί να εκτιμηθεί στον πίνακα 6.



Εικόνα 6.

	H159Y(+)	H159Y(-)	p
Age of Onset	<i>n</i> =22	<i>n</i> =40	
<i>Mean ± SD</i>	29.7 ± 8.7	34.2 ± 10.2	0.096**
<i>Median</i>	28	32.5	
<i>Min/Max</i>	15/49	20/60	
Disease Duration	<i>n</i> =22	<i>n</i> =37	
<i>Mean ± SD</i>	10.6 ± 6.5	10.5 ± 8.4	0.83**
<i>Median</i>	9	9	
<i>Min/Max</i>	1/43	1/25	
MSSS	<i>n</i> =22	<i>n</i> =37	
<i>Mean ± SD</i>	4 ± 2.2	4.7 ± 2.4	0.22**
<i>Median</i>	3.9	4.2	
<i>Min/Max</i>	0.78/8.34	0.28/9.75	
<i>Benign MS n(%)</i>	3 (13.6%)	4 (10.8%)	0.72*
<i>Moderate MS n(%)</i>	17 (77.3%)	27 (73%)	
<i>Severe MS n(%)</i>	2 (9.1%)	6 (16.2%)	
EDSS	<i>n</i> =22	<i>n</i> =39	
<i>Median</i>	2	3	0.59**
<i>Min/Max</i>	1/7	0/9	
0-2.5	13 (59.1%)	18 (46.2%)	0.52**
3-5.5	4 (18.2%)	14 (35.9%)	
6-6.5	4 (18.2%)	5 (12.8%)	
7-10	1 (4.5%)	2 (5.1%)	
*Pearsons chi-square			**Mann-Whitney-U test
Πίνακας 6. Ανάλυση υποομάδας P21R-θετικών ασθενών			

3. Συζήτηση

3.1 Σύνοψη Ενδείξεων

Γονιδιακή ανάλυση του αλληλουχίας του γονιδίου του BAFFR, έχει αποκαλύψει την παρουσία διάφορων πολυμορφισμών, από τους οποίους ο P21R και ο H159Y έχουν συσχετιστεί με διάφορους παθολογικούς φαινοτύπους. Παρόλα αυτά, τα προαναφερθέντα αλληλόμορφα έχουν εντοπιστεί και σε υγιή άτομα, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία αυτών των πολυμορφισμών μόνη της, μπορεί να μην επαρκεί για τον προσδιορισμό του κλινικού φαινοτύπου [39, 58]. Στην παρούσα μελέτη θέλαμε να εξετάσουμε την πιθανή επίδραση που θα μπορούσε να έχει η παρουσία των μεταλλάξεων αυτών του υποδοχέα του BAFF, στον κλινικό φαινότυπο της σκλήρυνσης κατά πλάκας.

Όσον αφορά την P21R μετάλλαξη τα ενδεχόμενα που θεωρήσαμε ήταν δύο. Πρώτων από τη στιγμή που η μετάλλαξη αυτή θεωρείται υπεύθυνη για μειωμένη δυναμικότητα σύνδεσης μεταξύ BAFF & BAFFR, η δράση της θα μπορούσε να είναι κατασταλτική ως προς την ενεργότητα της φλεγμονώδους αντίδρασης στο ΚΝΣ. Μειωμένη σύνδεση του BAFF με τον BAFFR έχει ως αποτέλεσμα περιορισμένη ενεργοποίηση του NF-κΒ [52] που οδηγεί σε μειωμένη επιβίωση των Β λεμφοκυττάρων. Η μείωση της επιβίωσης των Β-λεμφοκυττάρων και συγκεκριμένα των αυτό-αντιδραστικών κλώνων, θα μπορούσε να προσδώσει στους ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας μία σχετική προστασία από τις αυτό-άνοσες Β-κυτταρικές απαντήσεις. Στη βιβλιογραφία όμως έχουμε δει ότι η P21R μετάλλαξη αν και σχετίζεται με μειωμένη σύνδεση που μπορεί μάλιστα να είναι της τάξης του 50% δεν συνοδεύεται από ανάλογη μείωση του αριθμού των Β-λεμφοκυττάρων [52]. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να σημαίνει ότι η υπόθεση τη προστασίας λόγω μειωμένης επιβίωσης των αυτό-αντιδραστικών Β-κλώνων καταρρέει.

Από την άλλη πλευρά, μία πρόσφατη μελέτη μας έδειξε ότι μειωμένη δυνατότητα σύνδεσης του BAFF στον κύριο προσδέτη του, που είναι ο BAFFR, μπορεί να οδηγήσει σε υπερέκφραση του BAFF [68]. Επίσης, γνωρίζουμε πλέον ότι στο ΚΝΣ τα αστροκύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν υψηλές ποσότητες του BAFF όταν διεγερθούν [44, 46]. Εάν ο μηχανισμός αυτός είναι πραγματικά σε θέση να οδηγήσει σε υπερέκφραση του BAFF, το αποτέλεσμα θα είναι επιζήμιο για τους ασθενείς με

σκλήρυνση κατά πλάκας, καθώς μέσω της δράσης του BAFF σε άλλους κυτταρικούς υποδοχείς όπως ο TACI, δίνεται η δυνατότητα να ενισχυθούν οι T-ανεξάρτητες B-κυτταρικές απαντήσεις [43] προκαλώντας ή μεγιστοποιώντας τη βλάβη στο νευρικό ιστό. Επιπλέον, ο BAFF μπορεί να δράσει απευθείας στον NgR υποδοχέα των νευρώνων [44, 64, 69] συμβάλλοντας στην εκφύλιση τους. Τα σενάρια αυτά δεν είναι παράλογα εάν συλλογιστούμε ότι ο BAFF έχει ανιχνευθεί στο ΚΝΣ, αλλά και στις αλλοιώσεις της σκλήρυνσης κατά πλάκας και έχει συσχετιστεί με τη βαρύτητα της νόσου [65-67]. Οι παράγοντες βέβαια που μπορεί να προκαλέσουν υπερέκφραση του BAFF είναι πολλοί και διάφοροι μεταξύ των οποίων τα οιστρογόνα, ο αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων και διάφορες κυτταροκίνες όπως οι ιντερφερόνες τύπου 1, η ιντερφερόνη γ και η ιντερλευκίνη 10 [44, 46], ενώ η χρήση της ιντερφερόνης-β στην θεραπεία των ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας προκαλεί περεταίρω σύγχυση.

Η H159Y μετάλλαξη γνωρίζουμε ότι επηρεάζει την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με μόρια TRAF, και συνεπώς συμβάλει στην ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης του NF-κΒ [57]. Για το λόγο αυτό η παρουσία της έχει συσχετιστεί με υπερπλαστικές καταστάσεις της B-κυτταρικής σειράς, όπως η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και διάφορους τύπους non-Hodgkin λεμφώματος [44, 57, 60, 61]. Επιπλέον, η H159Y μετάλλαξη εμφανίζεται μόνο σε άτομα που φέρουν και την P21R μετάλλαξη, καθώς βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης μαζί της. Θεωρήσαμε λοιπόν πιθανό ότι ο H159Y πολυμορφισμός μπορεί έχει την ικανότητα να αντirroπεί την αρνητική επίδραση που έχει η P21R μετάλλαξη στην επιβίωση των B-κυττάρων και για αυτό τον λόγο να σχετίζεται με δυσμενέστερο κλινικό φαινότυπο της νόσου.

3.2 Αποτελέσματα

Στην παρούσα μελέτη δεν κατορθώσαμε να αποδείξουμε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης μεταξύ της γονοτυπικής κατανομής των P21R και H159Y πολυμορφισμών με τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως την βαρύτητα της νόσου, το βαθμό αναπηρίας, την ηλικία έναρξης της νόσου και τη διάρκεια της νόσου. Η μόνη σχέση που εντοπίσαμε ήταν στην υποομάδα των ασθενών που έφεραν τον P21R πολυμορφισμό, όπου φάνηκε μια διαφορά στην ηλικία έναρξης της νόσου, με μικρότερη ηλικία έναρξης νόσου για τους ασθενείς που ήταν θετικοί και για τον H159Y

πολυμορφισμό. Το αποτέλεσμα αυτό συνηγορεί με τη θεωρία σχετικά με τη συμβολή της H159Y μετάλλαξης στην επιβίωση των αυτό-αντιδραστικών B-λεμφοκυττάρων εξαιτίας ενεργοποίησης της NF-κΒ οδού σηματοδότησης, ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Τέλος, παρατηρήσαμε παρόμοιες συχνότητες των αλληλόμορφων μεταξύ ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας και υγιών μαρτύρων, κάτι που ήταν αναμενόμενο λαμβάνοντας υπόψη ότι τα προαναφερθέντα αλληλόμορφα έχουν εντοπιστεί και σε υγιή άτομα.

Παρά τις πολλαπλές ενδείξεις για τη συμβολή του BAFF στην παθοφυσιολογία της πολλαπλής σκλήρυνσης, η συσχέτιση της υπερέκφρασης του BAFF με την σοβαρότητα της νόσου δεν είναι τόσο απλή. Σε αντίθεση με τις αναφορές όπου η παρουσία του BAFF στο ΚΝΣ έχει συσχετιστεί με αυξημένη βαρύτητα νόσου [65-67], έρχονται τα αποτελέσματα της μελέτης του Kannel et al [75] όπου οι ερευνητές παρατήρησαν ότι οι ασθενείς με σταθερή νόσο εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα του BAFF στο αίμα. Η συγκεκριμένη παρατήρηση υποδηλώνει ότι δεν μπορεί τόσο αφελώς να αποδοθεί μια επιζήμια επίδραση του BAFF στην παθογένεση της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από τα ευρήματα των κλινικών δοκιμών ATAMS [76] & ATON [77], όπου η χρήση του Atacicept δεν κατάφερε να βελτιώσει την κλινική εικόνα της πολλαπλής σκλήρυνσης, αλλά αντιθέτως είχε επιζήμια αποτελέσματα ενισχύοντας την ενεργότητα της νόσου σε ορισμένους ασθενείς. Το Atacicept είναι μία ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη η οποία περιέχει της περιοχές σύνδεσης του BAFF και του APRIL και κατορθώνει να μπλοκάρει την σηματοδότηση καθώς συνδέεται με τους αντίστοιχους υποδοχείς μεταξύ των οποίων είναι ο BAFFR. Σε αντίθεση όμως με τα αποτελέσματα του Kannel et al, έρχονται τα ευρήματα του Kim et al [70] όπου μεταλλαγμένα BAFFR-ανεπαρκή ποντίκια με πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, παρουσίαζαν ένα φαινότυπο με ταχύτερη έναρξη την νόσου και πιο διάσπαρτη φλεγμονή στο νωτιαίο μυελό, ενώ εμφάνιζαν αυξημένες συγκεντρώσεις του BAFF τόσο συστηματικά όσο και στο ΚΝΣ.

Αυτά τα αντιφατικά ευρήματα σχετικά με την επίδραση του BAFF, ιδίως μεταξύ των παρατηρήσεων του Kannel et al, όπου οι συγκεντρώσεις του BAFF εξετάστηκαν στο αίμα των ασθενών, και τις αναφορές άλλων μελετών που αξιολόγησαν τον συνδέτη στο ΚΝΣ, θα μπορούσαν να ερμηνευτούν στο πλαίσιο μιας ανοσο-διαμερισματικής προσέγγισης στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης. Σύμφωνα με αυτή τη προσέγγιση το περιφερικό διαμέρισμα μπορεί να οδηγεί την φλεγμονώδη αντίδραση και να ευθύνεται για την υποτροπιάζουσα νόσο, ενώ το διαμέρισμα του ΚΝΣ να

σχετίζεται περισσότερο με την προοδευτική νόσο που χαρακτηρίζεται από νευροεκφυλισμό [78].

3.3 Περιορισμοί

Η θεραπεία των ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας με τροποποιητικά της νόσου φάρμακα μπορεί να αποτελεί πεδίο σύγχυσης στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που έχουν να κάνουν με την κλινική έκφραση της νόσου. Ιδίως η χρήση αγωγών όπως είναι η ιντερφερόνη-β, η οποία γνωρίζουμε ότι μπορεί να οδηγήσει σε υπερέκφραση του BAFF στον ορό [75, 79, 80], προκαλεί περεταίρω σύγχυση αν αναλογιστούμε ότι στην παρούσα μελέτη η παρουσία της P21R μετάλλαξης του BAFFR πιθανώς να συσχετίζεται με την έκφραση του BAFF, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στην παθογένεια της νόσου. Η απουσία λοιπόν δεδομένων σχετικά με τη χρήση τροποποιητικών της νόσου φαρμάκων αποτελεί παράγοντα σύγχυσης και περιορισμό στη συγκεκριμένη μελέτη. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη την ελαττωμένη συχνότητα εμφάνισης αυτών των πολυμορφισμών αλλά και την παρουσία τους στον υγιή πληθυσμό, η παρούσα μελέτη πιθανώς να μην είχε το απαραίτητο αριθμητικά δείγμα ασθενών για να ανιχνεύσει λεπτές διαφορές, όπως στην περίπτωση της ηλικίας έναρξης της νόσου σε P21R(+)/H159Y(+) ασθενείς.

3.4 Συμπεράσματα.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά, όπου έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί η επίδραση μεταλλάξεων του BAFFR σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας. Ωστόσο, σε αντίθεση με την προαναφερθείσα πειραματική μελέτη [70] η οποία συσχέτισε την έκφραση του BAFFR με κλινικά χαρακτηριστικά της αυτοάνοσης πειραματικής εγκεφαλοπάθειας σε ποντίκια, η μελέτη μας απέτυχε να αποδείξει την ύπαρξη σχέσης μεταξύ των P21R & H159Y πολυμορφισμών του BAFFR και της κλινικής εικόνας των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση. Παρά την αποτυχία της μελέτης, υπάρχουν ενδείξεις όσων αφορά την ηλικία έναρξης και λαμβάνοντας υπόψη την πολυπαραγοντική φύση της πολλαπλής σκλήρυνσης, τα ευρήματα αυτά θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή και όχι να απορριφθούν ελαφρά τη καρδιά ως αρνητικά.

Εξάλλου η αποτυχία του Atacicept καταδεικνύει ότι η συμβολή της οδού σηματοδότησης του BAFF-BAFFR δεν είναι ξεκάθαρη, αλλά απαιτείται περεταίρω έρευνα για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στην παθογένεια της σκλήρυνσης κατά πλάκας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. Lancet, 2008. **372**(9648): p. 1502-17.
2. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. Lancet, 2002. **359**(9313): p. 1221-31.
3. Compston, A., *Jean-Martin Charcot on 'Sclérose en plaques' (Multiple Sclerosis)*. ACNE, September/October 2005. **5**(4): p. 28-29.
4. Clanet, M., *Jean-Martin Charcot. 1825 to 1893*. Int MS J, 2008. **15**(2): p. 59-61.
5. Srivastava, P., M.A. Mujtaba, and M. Singhal, *Gene and Cytokines expression of Multiple Sclerosis and its therapeutic regimen: A Systemic Review*. International Journal of Drug Development and Research, 2012.
6. Hemmer, B., J.J. Archelos, and H.P. Hartung, *New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(4): p. 291-301.
7. Hirtz, D., et al., *How common are the "common" neurologic disorders?* Neurology, 2007. **68**(5): p. 326-37.
8. Hogancamp, W.E., M. Rodriguez, and B.G. Weinshenker, *The epidemiology of multiple sclerosis*. Mayo Clin Proc, 1997. **72**(9): p. 871-8.
9. Kurtzke, J.F., *A reassessment of the distribution of multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 1975. **51**(2): p. 137-57.
10. Kurtzke, J.F., *A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one*. Acta Neurol Scand, 1975. **51**(2): p. 110-36.
11. Zivadinov, R., et al., *The use of standardized incidence and prevalence rates in epidemiological studies on multiple sclerosis. A meta-analysis study*. Neuroepidemiology, 2003. **22**(1): p. 65-74.
12. Rosati, G., *Descriptive epidemiology of multiple sclerosis in Europe in the 1980s: a critical overview*. Ann Neurol, 1994. **36 Suppl 2**: p. S164-74.
13. Kurtzke, J.F., *MS epidemiology world wide. One view of current status*. Acta Neurologica Scandinavica, 1995. **91**(S161): p. 23-33.
14. Piperidou, H.N., et al., *Epidemiological data of multiple sclerosis in the province of Evros, Greece*. Eur Neurol, 2003. **49**(1): p. 8-12.
15. D, V., *Epidemiological Data for Multiple Sclerosis in Greece*. Neuroepidemiology 1984. **3**: p. 52-56.
16. Milonas, I., S. Tsounis, and I. Logothetis, *Epidemiology of multiple sclerosis in northern Greece*. Acta Neurol Scand, 1990. **81**(1): p. 43-7.
17. Ascherio, A. and K.L. Munger, *Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors*. Ann Neurol, 2007. **61**(6): p. 504-13.
18. Marrie, R.A., *Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology*. Lancet Neurol, 2004. **3**(12): p. 709-18.
19. Alonso, A. and M.A. Hernan, *Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review*. Neurology, 2008. **71**(2): p. 129-35.
20. Pugliatti, M., S. Sotgiu, and G. Rosati, *The worldwide prevalence of multiple sclerosis*. Clin Neurol Neurosurg, 2002. **104**(3): p. 182-91.
21. Ascherio, A., K.L. Munger, and K.C. Simon, *Vitamin D and multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2010. **9**(6): p. 599-612.

22. Milo, R. and E. Kahana, *Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p. A387-94.
23. Dyment, D.A., G.C. Ebers, and A.D. Sadovnick, *Genetics of multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2004. **3**(2): p. 104-10.
24. Ascherio, A. and K.L. Munger, *Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection*. Ann Neurol, 2007. **61**(4): p. 288-99.
25. Gilden, D.H., *Infectious causes of multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2005. **4**(3): p. 195-202.
26. Stadelmann, C., *Multiple sclerosis as a neurodegenerative disease: pathology, mechanisms and therapeutic implications*. Curr Opin Neurol, 2011. **24**(3): p. 224-9.
27. Claes, N., et al., *B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions*. Frontiers in Immunology, 2015. **6**: p. 642.
28. Weiner, H.L., *Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease*. Arch Neurol, 2004. **61**(10): p. 1613-5.
29. Dendrou, C.A. and L. Fugger, *Immunomodulation in multiple sclerosis: promises and pitfalls*. Curr Opin Immunol, 2017. **49**: p. 37-43.
30. Chari, D.M., *Remyelination in multiple sclerosis*. Int Rev Neurobiol, 2007. **79**: p. 589-620.
31. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.
32. Tsang, B.K. and R. Macdonell, *Multiple sclerosis- diagnosis, management and prognosis*. Aust Fam Physician, 2011. **40**(12): p. 948-55.
33. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria*. Annals of Neurology, 2011. **69**(2): p. 292-302.
34. Filippi, M., et al., *MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines*. Lancet Neurol, 2016. **15**(3): p. 292-303.
35. Rashid, W. and D.H. Miller, *Recent advances in neuroimaging of multiple sclerosis*. Semin Neurol, 2008. **28**(1): p. 46-55.
36. Gronseth, G.S. and E.J. Ashman, *Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology*. Neurology, 2000. **54**(9): p. 1720-5.
37. Link, H. and Y.M. Huang, *Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness*. J Neuroimmunol, 2006. **180**(1-2): p. 17-28.
38. Phadke, J.G., *Survival pattern and cause of death in patients with multiple sclerosis: results from an epidemiological survey in north east Scotland*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1987. **50**(5): p. 523-31.
39. Losi, C.G., et al., *Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency*. J Clin Immunol, 2005. **25**(5): p. 496-502.
40. Thompson, J.S., et al., *BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2108-11.
41. Woodland, R.T., M.R. Schmidt, and C.B. Thompson, *BLyS and B cell homeostasis*. Semin Immunol, 2006. **18**(5): p. 318-26.

42. Kayagaki, N., et al., *BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2*. *Immunity*, 2002. **17**(4): p. 515-24.
43. Mackay, F. and J.L. Browning, *BAFF: a fundamental survival factor for B cells*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(7): p. 465-75.
44. Vincent, F.B., et al., *The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013. **24**(3): p. 203-15.
45. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(1): p. 19-26.
46. Mackay, F. and P. Schneider, *Cracking the BAFF code*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(7): p. 491-502.
47. Ng, L.G., et al., *B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(2): p. 807-17.
48. Huard, B., et al., *T cell costimulation by the TNF ligand BAFF*. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6225-31.
49. Kim, H.M., et al., *Crystal structure of the BAFF-BAFF-R complex and its implications for receptor activation*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(5): p. 342-8.
50. Xu, H.C., et al., *Deficiency of the B cell-activating factor receptor results in limited CD169+ macrophage function during viral infection*. *J Virol*, 2015. **89**(9): p. 4748-59.
51. Lougaris, V., et al., *Monoallelic BAFFR P21R/H159Y Mutations and Familial Primary Antibody Deficiencies*. *J Clin Immunol*, 2016. **36**(1): p. 1-3.
52. Pieper, K., et al., *A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization, contributing to common variable immunodeficiency*. *J Allergy Clin Immunol*, 2014. **133**(4): p. 1222-5.
53. *GeneCards HUMAN GENE DATABASE*. 2017 [cited 2017 15th August]; TNFRSF13C Gene]. Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF13C>.
54. Kompoti, M., et al., *Genetic polymorphisms of innate and adaptive immunity as predictors of outcome in critically ill patients*. *Immunobiology*, 2015. **220**(3): p. 414-21.
55. NCBI. *Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs77874543* dbSNP Short Genetic Variations 2017 [cited 2017 15th August]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=ad hoc_search&type=rs&rs=rs77874543#validation.
56. NCBI. *Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs61756766* dbSNP Short Genetic Variations 2017 [cited 2017 15th August]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=61756766.
57. Hildebrand, J.M., et al., *A BAFF-R mutation associated with non-Hodgkin lymphoma alters TRAF recruitment and reveals new insights into BAFF-R signaling*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2010. **207**(12): p. 2569-2579.
58. Germinaro, M., et al., *Association of B-cell activating factor receptor deficiency with the P21R polymorphism and common variable immunodeficiency*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2015. **115**(1): p. 82-3.
59. van Schouwenburg, P.A., et al., *Application of whole genome and RNA sequencing to investigate the genomic landscape of common variable immunodeficiency disorders*. *Clin Immunol*, 2015. **160**(2): p. 301-14.

60. Papageorgiou, A., et al., *A BAFF receptor His159Tyr mutation in Sjogren's syndrome-related lymphoproliferation*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(10): p. 2732-41.
61. Jasek, M., et al., *Association of variants in BAFF (rs9514828 and rs1041569) and BAFF-R (rs61756766) genes with the risk of chronic lymphocytic leukemia*. Tumour Biol, 2016. **37**(10): p. 13617-13626.
62. Steri, M., et al., *Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk*. N Engl J Med, 2017. **376**(17): p. 1615-1626.
63. Thangarajh, M., et al., *Expression of B-cell-activating factor of the TNF family (BAFF) and its receptors in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2004. **152**(1-2): p. 183-90.
64. Krumbholz, M., et al., *BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 195-200.
65. Ragheb, S., et al., *Multiple sclerosis: BAFF and CXCL13 in cerebrospinal fluid*. Mult Scler, 2011. **17**(7): p. 819-29.
66. Wang, H., et al., *Cerebrospinal fluid BAFF and APRIL levels in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients during relapse*. J Clin Immunol, 2012. **32**(5): p. 1007-11.
67. Quan, C., et al., *Impaired regulatory function and enhanced intrathecal activation of B cells in neuromyelitis optica: distinct from multiple sclerosis*. Mult Scler, 2013. **19**(3): p. 289-98.
68. Kreuzaler, M., et al., *Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 497-503.
69. Zhang, L., et al., *Identification of BLyS (B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor*. J Neurosci, 2009. **29**(19): p. 6348-52.
70. Kim, S.S., et al., *Accelerated central nervous system autoimmunity in BAFF-receptor-deficient mice*. J Neurol Sci, 2011. **306**(1-2): p. 9-15.
71. Kurtzke, J.F., *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. Neurology, 1983. **33**(11): p. 1444-52.
72. Roxburgh, R.H., et al., *Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity*. Neurology, 2005. **64**(7): p. 1144-51.
73. Pachner, A.R. and I. Steiner, *The multiple sclerosis severity score (MSSS) predicts disease severity over time*. J Neurol Sci, 2009. **278**(1-2): p. 66-70.
74. Dardiotis, E., et al., *Gene variants of adhesion molecules act as modifiers of disease severity in MS*. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2017. **4**(4): p. e350.
75. Kannel, K., et al., *Changes in Blood B Cell-Activating Factor (BAFF) Levels in Multiple Sclerosis: A Sign of Treatment Outcome*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0143393.
76. Kappos, L., et al., *Atacicept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial*. Lancet Neurol, 2014. **13**(4): p. 353-63.
77. Sergott, R.C., et al., *ATON: results from a Phase II randomized trial of the B-cell-targeting agent atacicept in patients with optic neuritis*. J Neurol Sci, 2015. **351**(1-2): p. 174-8.

78. Baker, D., et al., *Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis*. EBioMedicine, 2017. **16**: p. 41-50.
79. Krumbholz, M., et al., *Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity*. Brain, 2008. **131**(Pt 6): p. 1455-63.
80. Hedegaard, C.J., et al., *Interferon-beta increases systemic BAFF levels in multiple sclerosis without increasing autoantibody production*. Mult Scler, 2011. **17**(5): p. 567-77.